

THESIS

MÜNICH

1968

SERUMPROTEINBINDUNG VON ADRENOCORTICOTROPIN
EIN BEITRAG ZUM PROBLEM DER BESTIMMUNG VON
ACTH - PLASMA - SPIEGELN

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

KLAUS v. WERDER

MÜNCHEN

1968

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. DR. GUSTAV BODECHTEL

SERUMPROTEINBINDUNG VON ADRENOCORTICOTROPIN
EIN BEITRAG ZUM PROBLEM DER BESTIMMUNG VON ACTH-PLASMA-
SPIEGELN ⁺⁾

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
KLAUS v. WERDER
AUS
MÜNCHEN
1968

⁺⁾ MIT UNTERSTÜTZUNG DER STIFTUNG VOLKSWAGENWERK UND DER
DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. P. C. Scriba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.68

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

MEINEN ELTERN

Herrn Prof. Dr. med. K. SCHWARZ danke ich für seinen Rat und für die großzügige Unterstützung, die er mir und meiner Arbeit gewährte.

Besonders herzlichen Dank schulde ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. C. SCRIBA für seine unermüdliche Hilfe und für die freundliche Überlassung des Themas.

Fräulein S. v. GÜNTHER und Fräulein F. SEDLMAIER danke ich für ihre sorgfältige Assistenz bei vielen Versuchen, Fräulein F. HAAG für das Anfertigen der fotografischen Abbildungen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
LISTE DER ABKÜRZUNGEN	
EINLEITUNG	1
PRÄPARATE UND METHODEN	4
1. ACTH-Lösungen	4
2. Dextrangelfiltration	6
3. Fraktionssammeln	8
4. Saccharosedichtgradientenzentrifugation	9
5. Proteinbestimmung nach LOWRY	12
6. Papierelektrophorese	13
7. Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie	13
8. Hypophysektomie bei der Ratte auf parapharyngealem Wege	16
9. Arterielle und venöse Katheter bei der Ratte	17
10. Sammeln des Nebennierenvenenblutes und fluorimetrische Corticosteronbestimmung im Plasma der Ratte	20
11. Gewinnung von menschlichem Plasma	22
12. ACTH-Bestimmung	22
13. ACTH-Extraktion aus Geweben	24
14. Immunisieren von Meerschweinchen mit ACTH	24
15. Gewinnung von Meerschweinchen-Plasma	25
ERGEBNISSE	26
1. Vorversuche	26
A. Orientierender Vorversuch zur Proteinbindung von ACTH	26
B. Säulenchromatographische Reinigung von ^3H -ACTH	26
C. Stabilität des ^3H -ACTH	31
2. Bindung von ACTH an Serumproteine	33
A. Dextrangelfiltration	33
B. Saccharosedichtgradientenzentrifugation	39
3. ACTH-Bestimmungen im Plasma und Tumor bei ektopischem ACTH-Syndrom	51

A. Kasuistische Beiträge	51
B. Besprechung der Ergebnisse	56
4. Vorversuche zur immunologischen ACTH-Bestimmung	59
DISKUSSION	63
ZUSAMMENFASSUNG	70
LITERATURVERZEICHNIS	74
LEBENS LAUF	

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

μCi	Mikro-Curie
μg	Mikro-gramm
M	molar
N	normal
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
^3H -ACTH	Tritium markiertes synthetisches ACTH (^3H - β^{1-23} Corticotropin-23-amid-acetat)
11-OHCS	11-Hydroxycorticosteroide
IE	Internationale Einheit
mE	Millieinheit
HVL	Hypophysenvorderlappen
NNR	Nebennierenrinde
NS	Normalserum
IPM	Impulse pro Minute
DPM	Desintegrationen pro Minute
UPM	Umdrehungen pro Minute
HKE	Haematokriteinheiten
Wfq	Wiederfindequote
Bulbus c. v. j.	Bulbus cranialis venae jugularis
Σ	Summe
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	Standardabweichung des Mittelwerts



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Die Entdeckung einer Substanz mit adrenocorticotroper Aktivität, die in der Hypophyse gebildet wird, muß einer ganzen Reihe von Forschern zugeschrieben werden. In den zwanziger Jahren konnte SMITH erstmalig zeigen, daß die Hypophysektomie bei Ratten zur Atrophie der Nebennierenrinde führt (1), die durch Implantation von Hypophysenvorderlappen wieder zu beseitigen ist. COLLIP, ANDERSON und THOMSON konnten 1933 (2), ebenso wie ANSELMINO und HOFFMANN 1934 (3,4) diese, als adrenocorticotropes Hormon bezeichnete Substanz, in Acetontrockenpulver von Rinder-Hypophysenvorderlappen anreichern.

1942 konnten LI, EVANS und SIMPSON (5) an der Universität von Kalifornien aus Schafshypophysen ein offenbar homogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 20 000 gewinnen, das ACTH-Aktivität aufwies. 1954 wurde von LI und Mitarbeitern (6) ein Polypeptid mit ACTH-Aktivität aus Schafshypophysen in Reinform isoliert. In den darauffolgenden Jahren wurde das adrenocorticotrope Hormon aus Schaf-, Schweine-, und Rinder-Hypophysen isoliert und in seiner jeweiligen Aminosäuresequenz aufgeklärt (7,8).

Es handelt sich um einkettige Polypeptide, die aus 39 Aminosäuren bestehen, mit einem Molekulargewicht von 4500. Dabei ist die Aminosäuresequenz der ersten 24 Aminosäuren der Adrenocorticotropine verschiedener Spezies identisch; die Aminosäuren 25 - 33 sind bei den einzelnen Arten verschieden; der Rest ist bei den untersuchten ACTH-Peptiden wieder gleich.

1960 wurde in dem Laboratorium von LI (9) ein Nonadeca-peptid synthetisiert, das aus den ersten 19 Aminosäuren des nativen ACTH bestand und biologische ACTH-Aktivität aufwies. 1963 konnten SCHWYZER und Mitarbeiter (10) über die vollständige Synthese eines ACTH-Peptids mit 39 Aminosäuren berichten.

Inzwischen war man sich längst über die bedeutende Rolle, die das ACTH in der Klinik endokriner Krankheiten spielt, klar geworden. Eine einfache, empfindliche, genaue und spezifische Meßmethode für das ACTH, das im menschlichen Plasma in einer Konzentration von 0.003 bis 0.006 mE/ml vorliegt (11-14), wäre von großer diagnostischer Bedeutung. Ein chemischer ACTH-Nachweis ist wegen der geringen Konzentration nicht möglich; außerdem unterscheiden sich die Sequenz der 39 Aminosäuren nicht

hinreichend von derjenigen anderer Polypeptide und Plasmaproteine. Die bis jetzt gebräuchlichen Tests zur ACTH-Bestimmung beruhen deshalb auf biologischen Prinzipien, wobei sich die ACTH-spezifische Wirkung auf die Nebennierenrinde als Parameter besonders eignet. So wurde von SAYERS (15) ein Test entwickelt, bei dem die ACTH-Konzentration an Hand des Ascorbinsäureschwundes der Nebenniere einer hypophysektomierten Ratte nach intravenöser ACTH-Applikation bestimmt wird. Der Test beruht auf einer zufälligen Beobachtung und die biologische Bedeutung des Phänomens ist nicht geklärt. Die steroidogene Wirkung des ACTH ist die Grundlage der biologischen ACTH-Bestimmung von LIPSCOMB und NELSON (16). Diese Methode wurde von uns in einer Modifikation von VANCE und GIRARD (17) benutzt. Dabei wird der Anstieg der Corticosteroninkretion im Nebennierenvenenblut von hypophysektomierten Ratten nach intraaortaler ACTH-Gabe fluorimetrisch nach ZENKER und BERNSTEIN (18) bestimmt. Nach diesem Verfahren wurden in unserem Labor ACTH-Plasmaspiegel bei verschiedenen endokrinen Krankheiten bestimmt (19,20,21). Ebenso wurden mit dieser Methode ACTH-Aktivitäten in Tumoren bestimmt und theoretischen Fragen wie Serumproteinbindung von ACTH nachgegangen (21,22). Mit allen bisher bekannten Methoden sind aber nur erhöhte ACTH-Plasmaspiegel direkt meßbar. Durch recht mühselige Extraktionsverfahren hat man versucht, auch physiologische ACTH-Konzentrationen im Plasma indirekt biologisch zu bestimmen (23-25). Wegen der erforderlichen Blutmenge bis zu 500 ml je Bestimmung und der unsicheren Ausbeute von endogenem ACTH bei der Extraktion ist dieses Verfahren für klinische Zwecke nicht geeignet.

Deshalb hat man sich bemüht neben den biologischen ACTH-Bestimmungen radioimmunologische Methoden zu entwickeln, wie sie für Insulin schon länger bekannt sind (26). Dabei sind die unterschiedlichen Resultate für ACTH-Durchschnittswerte im Plasma nicht ohne weiteres erklärlich. So fanden FELBER und Mitarbeiter (27) eher hohe, YALOW, GLICK und BERSON (28) eher niedrige Durchschnittswerte für ACTH-Plasmaspiegel bei Normalen. Die Frage, wie weit biologisch und radioimmunologisch bestimmte ACTH-Plasmaspiegel vergleichbar sind, ist offen (29). Möglicherweise spielt die Bindung von ACTH an Serumproteine (21,22,30), die wir mit Hilfe der Dextrangelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation nachweisen konnten, dabei eine nicht unerhebliche Rolle.

Bei unseren Untersuchungen über die Proteinbindung von ACTH (21,22) benutzten

wir ein Tritium markiertes β^{1-23} Peptid, das in relativ niedriger spezifischer Aktivität vorlag (s. PRÄPARATE und METHODEN , 1. ACTH-Lösungen). Wir waren deshalb gezwungen in allen unseren Versuchen mit hohen, unphysiologischen Dosen zu arbeiten. Ein Vorteil der Tritium-Markierung war allerdings die lange Haltbarkeit des markierten, biologisch aktiven Peptids (s. ERGEBNISSE , 1. Vorversuche). Der von uns gefundene hohe Anteil von proteingebundenem exogenem ACTH, wobei wir die Proteinbindung auch von endogenem ACTH zumindestens qualitativ nachweisen konnten, könnte sowohl kompetitiv zum verwendeten Adsorbens (Ionenaustauschharze oder Dextrangel), wie zum Antikörper selbst wirken und somit das Ergebnis der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung verfälschen. Eine weitere Komplikation bei der radioimmunologischen Bestimmung ist die Tatsache, daß bei der immunologischen Methode auch biologisch inaktive Analoge des ACTH erfaßt werden (31). Wie man weiß, liegt die volle biologische ACTH-Aktivität in den ersten 19-24 Aminosäuren des Peptids. Der Peptidrest hat keine biologische Aktivität, aber antigene Potenz, sodaß die zwar gegen das Vollpeptid gebildeten Antikörper auch solche biologisch unwirksamen Peptidbruchstücke binden können. Daß der Peptidrest offenbar ein Schutz gegen die biologische Inaktivierung durch Serumproteine darstellt, konnten wir an Hand unserer Versuche zeigen.

Rein praktisches Interesse hatten wir an der Erzeugung von Antikörpern gegen ACTH. Die Frage nach der erforderlichen Menge des Antigens und der Ausbeute an Antikörper bildenden Tieren wurde von uns untersucht. Die hier vorgelegten Untersuchungen sollen als Vorversuche zu einer radioimmunologischen Bestimmung für ACTH verstanden werden.

PRÄPARATE und METHODEN

1.) ACTH-Lösungen^{†)}

Als markiertes ACTH wurde das β^{1-23} Corticotropin-23-amid-acetat (Abb. 1a) verwendet, das am Tyrosin (2. und 23. Aminosäure) katalytisch mit Tritium (32-34) markiert worden war (FARBERWERKE HOECHST AG). Es lag in drei spezifischen Aktivitäten vor : 180 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, 212 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ und 382 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Davon wurden, wenn nicht anders beschrieben, 2mg (= 200 IE, siehe unten) abgewogen und in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. 1 ml hiervon wurde sofort chromatografiert (siehe METHODEN und ERGEBNISSE), der Rest wurde bei - 18° C eingefroren.

Als natives ACTH wurde stark gereinigtes Schweine-ACTH (Cortrophine^R) von der Firma ORGANON verwendet (Abb. 1c). Davon entsprachen 0.4 mg gereinigtes Peptid 50 IE (Aktivitätsangabe der Firma), die in 25.4 mg Gesamttrockensubstanz pro Ampulle vorlagen. Die Verdünnungen wurden ebenfalls mit 0.9 % NaCl bei + 2° C vorgenommen.

Für die ACTH-Eichwerte (siehe METHODEN, 12. ACTH-Bestimmung) wurde das β^{1-23} Corticotropin-23-amid (Abb. 1b) verwendet, das in Ampullen mit je 0.25 mg Trockensubstanz vorlag. Dabei entsprachen im modifizierten SAYERS-Test (15) 0.01 mg 0.86 IE = 860 mE (35). Der Ampulleninhalt wurde in 2 ml Aqua dest. bei Zimmertemperatur gelöst. Die weiteren Verdünnungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung bei + 2° C vorgenommen, die in einzelnen Fraktionen zu ca 2 ml eingefroren (- 18° C) wurden. Wegen der geringen Haltbarkeit (siehe Ergebnisteil) wurden jeden 4.Tag neue ACTH-Standard-Lösungen hergestellt. (Abb. 1).

^{†)} Unser besonderer Dank gilt Herm Prof. v. Wasielewski, FARBERWERKE HOECHST AG, für die Überlassung des Tritium markierten ACTH. Ebenso sei Herm Priv. Doz. Dr. H. G. Vogel, FARBERWERKE HOECHST AG, und Herm Dr. Andraschko, ORGANON G.m.b.H., München-Pasing, für das uns zur Verfügung gestellte ACTH (β^{1-23} Corticotropin-23-amid und Cortrophine^R) herzlich gedankt.

³H - β ¹ - 23 CORTICOTROPIN - 23 - AMID - ACETAT

a.) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Pro-Val-Lys-Val-Tyr-NH-C-CH₃ mit Tritium katalytisch markiert .
 19 20 21 22 23 $\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}$

β ¹ - 23 CORTICOTROPIN - 23 - AMID

b.) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Pro-Val-Lys-Val-Tyr-NH₂
 19 20 21 22 23

SCHWEINE - A C T H (Cortrophine ^R)

c.) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

NH_2
 |
 Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-
 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

Leu-Glu-Phe-OH
 37 38 39

Abb. 1 : Struktur der von uns verwendeten ACTH-Peptide

- a.) Tritium markiertes 1-23 Peptid
- b.) Nicht markiertes 1-23 Peptid
- c.) Natives, aus Schweinehypophysen isoliertes 1-39 Peptid
 Davon unterscheidet sich menschliches ACTH nur geringfügig : Die 26. und 27. Aminosäure sind getauscht (ALA (26)-Gly (27)) und an Stelle des Leu (31) steht Ser (31).

Die ACTH-Aktivität des β^{1-23} Corticotropin-23-amid wurde in verschiedenen Tests mit dem International Working Standard für adrenocorticotropes Hormon verglichen (35). Dabei entsprach der Ascorbinsäureschwund in Nebennieren hypophysektomierter Ratten nach subcutaner Applikation des β^{1-23} Peptids 86 IE pro mg Pulver. Intravenöse Applikation ergab eine Aktivität von 242 IE pro mg verglichen mit dem International Working Standard. Im in vitro Test nach SAFFRAN und SCHALLY (36) wurde eine ACTH-Aktivität von 118 IE/mg gefunden. Diese völlig unterschiedlichen Resultate bei drei verschiedenen ACTH-Bestimmungsmethoden verdeutlichen die Problematik von ACTH-Aktivitätsbestimmungen mit allgemeiner Gültigkeit (37).

Wir entschlossen uns deshalb zu den 86 IE pro mg Trockensubstanz des β^{1-23} Peptids, da sowohl bei hochgereinigten nativen ACTH-Peptiden (38), wie auch bei synthetischem ACTH (39), die spezifische biologische Aktivität selten über 100 - 140 IE pro mg Trockensubstanz liegt (s. DISKUSSION). Beim Tritium markierten ACTH wurde einfach 1 mg Trockensubstanz = 100 IE gesetzt. Wir glaubten uns dazu berechtigt, zumal sich das Peptid nur durch die Tritiummarkierung und durch das säureamidisch gebundene Acetat am Tyrosin (23. Aminosäure) von dem β^{1-23} Corticotropin-23-amid unterschied. Außerdem konnten wir auf Grund unserer biologischen Bestimmungen (s. METHODEN) des ^3H -ACTH schließen, daß die spezifische biologische Aktivität des Tritium markierten Peptids nicht wesentlich von der des nicht markierten synthetischen ACTH verschieden war. Von der Firma selbst lag keine Aktivitätsangabe vor.

Auf ein Ansäuern der physiologischen Kochsalzlösung (21, 40), in der die verschiedenen ACTH-Peptide gelöst waren, wurde verzichtet, da zur Chromatographie (ERGEBNISSE, 1, u. 2.) und zur Inkubation (ERGEBNISSE, 4.) eine neutrale Lösung erwünscht war. Außerdem war die biologische ACTH-Aktivität von neutralen ACTH-Lösungen gegenüber sauren ACTH-Lösungen bei unserer biologischen Bestimmung nicht vermindert.

2.) Dextran-Gelfiltration :

a) Präparation des Gels (41, 42)

Als Dextran-Gel wurde Sephadex-G-25 fine von der Firma Pharmacia, Uppsala Schweden verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 1.8 g Sephadex-G-25

fine in ca 30 ml 0.01 M Na-phosphat-Puffer pH 7.4 60 bis 90 Minuten gequellt. Während dieser Zeit wurde immer wieder mit einem Glasstab aufgerührt, um Verklumpungen zu vermeiden und die Verunreinigungen in den Überstand zu bringen, der darauf abdekantiert wurde. Dieser Vorgang wiederholte sich 3 - 4 mal. Der Überstand blieb danach klar. Jetzt wurde bis zu einem Gesamtvolumen von ca 20 ml abdekantiert, erneut umgerührt und die Säule gefüllt. Für jeden Versuch wurde das Gel frisch bereitet, um Verunreinigungen, bedingt durch eine nicht vollständige Elution und bakterielle Besiedlung auszuschließen.

b) Präparation der Dextran-Gelsäule (41, 42)

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Standard-Säulen (23 cm lang, i. D. 0.8 cm) 15 cm hoch gefüllt (entspricht 1.7 g Sephadex-G-25 fine). Die Säule wurde vertikal aufgestellt und die Ausflusskapillare (i. D. 0.2) mit einem mit Klemme versehenen Gummischlauch verschlossen. Darauf wurde die Säule bis zu einem Drittel mit 0.01 M Na-phosphat-Puffer pH 7.4 gefüllt. Der Ausfluss wurde jetzt mit Glaswolle verschlossen, und darüber wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 0.1 cm in ca 0.5 cm Höhe geschichtet. Von der Menge der verwendeten Glaswolle hängt die Tropfgeschwindigkeit ab. Die Glasperlen verhindern das Verstopfen der Glaswolle mit Gelpartikeln und garantieren so eine konstante Tropfgeschwindigkeit für die Dauer der Elution. Nachdem etwaige Luftblasen in der Ausflusskapillare beseitigt worden waren, wurde die Säule mit Gelsuspension bis zum Rande gefüllt. Hatte sich diese in einer 3 bis 4 cm hohen Schicht abgesetzt, wurde die Ausflusskapillare geöffnet. Nach Sedimentation des Gels wurde der Überstand fast vollständig abgesaugt, die Grenzschicht mit einem Glasstab leicht aufgewirbelt und weitere Gelsuspension aufgeschüttet. Dies wurde so oft wiederholt, bis die gewünschte Gelbettlänge erreicht war. Jetzt wurde die Säule mit Puffer gespült, bis sich das Gelbett stabilisiert hatte (ca drei Gelbettvolumen Puffer). Eine mechanische Stabilisierung der Gelbetoberfläche mit Filterpapier oder Polyäthylenscheiben erwies sich wegen der geringen Gelbetoberfläche ($r = 0.4 \text{ cm}$) als nicht erforderlich (41).

c) Albuminabsättigung des Dextrangelbettes

Um zu verhindern, daß die ACTH-wirksamen Peptide nicht irreversibel an das Dextran-Gel gebunden werden und so eine ungenügende Wiederfindungsquote zur Folge haben (s. ERGEBNISSE, 1 b), wurde das Gelbett vor Auftragen der eigentlichen Probe, wenn nicht anders beschrieben, mit 3 ml 5% Human-Albuminlösung abgesättigt (43). Eine 20% Human-Albumin-Lösung (BEHRINGWERKE AG, Marburg) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung 1:4 verdünnt. Die Albuminlösung wurde vorsichtig mit der Pipette aufgetragen, nachdem vorher der über der Gelbetoberfläche stehende Puffer vollständig abgesaugt worden war. Nach dem Einsickern der Albuminlösung wurde dann mit 15 ml Na-phosphatpuffer pH 7.4 eluiert.

d) Auftragen der Proben

Der über dem Gelbett stehende Puffer wurde vollständig abgesaugt und die jeweilige Probe vorsichtig mit einer Pipette aufgetragen, ohne daß die Oberfläche des Gels aufgewirbelt wurde. Nachdem die Probe in das Gelbett eingedrungen war, wurde je 1 bis 2 ml 0.01 M Na-phosphatpuffer pH 7.4 aufgetragen, - dabei wurde die innere, frei über der Gelsäule stehende Wand des Chromatographie-Rohres abgespült. Nach Auftragen der zweiten Puffermenge wurde die Säule an das Puffervorratsgefäß angeschlossen. Der Filtrationsdruck betrug ca 80 cm Wassersäule. Sämtliche Versuche wurden bei + 3° C im Kühlraum durchgeführt.

e) Elution mit 0.1 N HCL

Um den Dextran-Gel gebundenen ACTH-Anteil zu eluieren, erwies es sich als notwendig, 0.1 N HCL zur Elution zu verwenden. Dabei wurde das Puffervorratsgefäß abgehängt, der über der Gelbetoberfläche stehende Puffer nicht abgesaugt, sondern nur das Vorratsgefäß mit der 0.1 N HCL angeschlossen. Der Filtrationsdruck betrug ebenso wie bei der Pufferelution 80 cm Wassersäule.

3.) Fraktionssammeln

Zwei verschiedene Methoden wurden angewendet, je nachdem welcher Zweck bei der Dextran-Gelfiltration verfolgt wurde.

a) "Chromatopart" - Technik (42)

Um eine Auftrennung der im Sephadex-Dextran-Gel fraktionierten Probe zu erfassen, wurden bestimmte Volumina automatisch gesammelt (Chromatopart, Fa. Bender und Hobein, München-Karlsruhe). Wenn nicht anders beschrieben, wurden 3 ml - Fraktionen gesammelt, die eine ausreichende Trennung ermöglichten. Mit dem Sammeln wurde sofort nach Anschluß an das Puffer-vorratsgefäß begonnen.

b) Batch - Technik (42)

Nachdem die Elutionsvolumina der zu messenden Gipfel mit der "Chromatopart"-Technik bestimmt waren, wurden jetzt die im Vorversuch fraktionierten Volumina, die den jeweils interessierenden Gipfel enthielten, ungeteilt in einem graduieren Reagenzglas mit Schliff aufgefangen. Nach der Filtration wurde das Eluat im Reagenzglas gut durchgeschüttelt, um gleiche Konzentration der Aktivität im Eluat zu erreichen. Von diesem Gesamtvolumen wurden, wenn nicht anders beschrieben, 0,5 ml abpipettiert und zur Zählung im Flüssigkeitsscintillationszähler aufbereitet.

4) Dichte-Gradienten-Zentrifugation

a) Herstellen des Saccharosedichtegradienten:

Die Dichtegradienten-Zentrifugation (44,45) ist eine einfache, dabei sehr elegante Methode, Moleküle verschiedener Molekulargewichte zu trennen oder deren Molekulargewichte durch Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten zu ermitteln. Saccharosedichtegradienten wurden nach dem Prinzip von BRITTEN und ROBERTS (46) hergestellt. Es wurde dabei der in Abb. 2 dargestellte Glasapparat verwendet (20,47), der bei geschlossenen Hähnen I und II gefüllt wurde. In den Schenkel A wurde 3,45 ml (Totvolumen A = 0,95 ml plus Nutzvolumen A = 2,5 ml) 13% Saccharose, 0,005 M $MgCl_2$, 0,025 M KCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7.5 gefüllt. In den Schenkel B wurden erst 0.35 ml (Totvolumen) der gleichen Lösung, aber ohne Saccharose, hineinpipettiert.

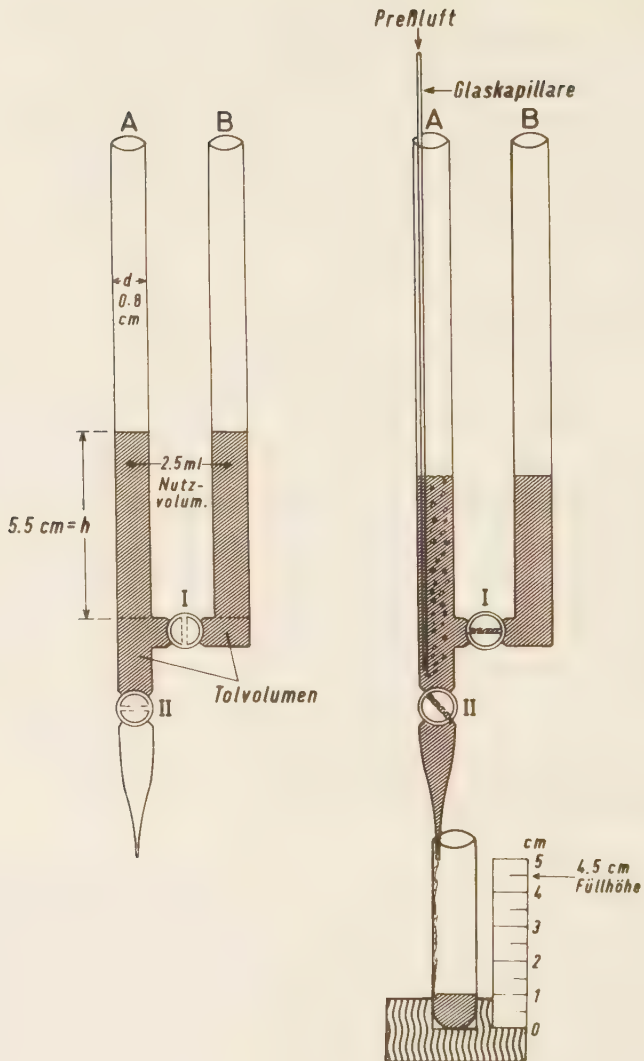


Abb. 2: Apparat zur Herstellung von Saccharosedichtegradienten (20,47).
Erklärung siehe Text.

Darauf wurden durch vorsichtiges sehr kurzes Öffnen etwaige Luftblasen aus dem Hahn I entfernt, um dann 2.5 ml (Nutzvolumen) nachzufüllen. Bevor die Preßluft angestellt wurde, die die Durchmischung des Inhalts von A sicherstellte, wurde sich überzeugt, daß die Flüssigkeitsspiegel in den Schenkeln A und B gleich hoch stehen. Nun wurde Hahn I geöffnet, Hahn II dagegen nur so wenig, daß ein langsames kontinuierliches Herausfließen gewährleistet war. Die Zentrifugenröhrchen (Cellulose Tubes, BECKMAN INSTRUMENTS Inc. Palo Alto, Calif., Nr. 305050) wurden bis zu einer Füllhöhe von 4.5 cm in ca. 7 - 10 Min. gefüllt.

Je drei auf diese Weise hergestellte Gradienten wurden im Swinging Bucket Rotor SW 39 der Spinco Model L Ultrazentrifuge (BECKMAN INSTRUMENTS, Inc. Palo Alto, Calif., USA) 2 Stunden bei 37 500 UPM bei $+ 2 - 4^{\circ} \text{C}$ zentrifugiert und damit stabilisiert.

b) Punktion des Zentrifugenröhrchens:

Zur Trennung der einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten wurde der Röhrchenboden mit einer abgesägten, zugespitzten Kanüle (No. 14) mit Mandrin punktiert. Die Kanüle wurde durch ein Stück Moosgummi gesteckt, das zur besseren Haftung am Zentrifugenröhrchen vorher gefettet wurde. Nach Punktion des Röhrchens wurde der Mandrin 1 - 2 mm nach oben gestoßen, um die Kanüle offen zu halten und dann herausgezogen. Darauf wurden die Fraktionen tropfenweise gesammelt.

c) Linearität des Dichtegradienten

Um die Linearität des Dichtegradienten zu prüfen (20,47), wurde der Saccharose-Lösung in Schenkel A Nilblausulfat zugesetzt (0.02%). Nach Punktion, Auffangen und Verdünnen der einzelnen Fraktionen (jeweils 4 Tropfen, von denen 0.2 ml mit 3 ml Aqua dest. verdünnt wurden), wurde die Nilblaukonzentration der einzelnen Proben im Photometer Eppendorf (Durchlaufküvette, d = 1 cm) bei 578 nm gemessen (Abb. 3). Die Abbildung zeigt, daß man einen nahezu linearen Gradienten von 13 - 5 % Saccharose erhält, wenn man die richtige Füllhöhe für die Zentrifugenröhrchen wählt (Versuche mit M. FRIES, 47).

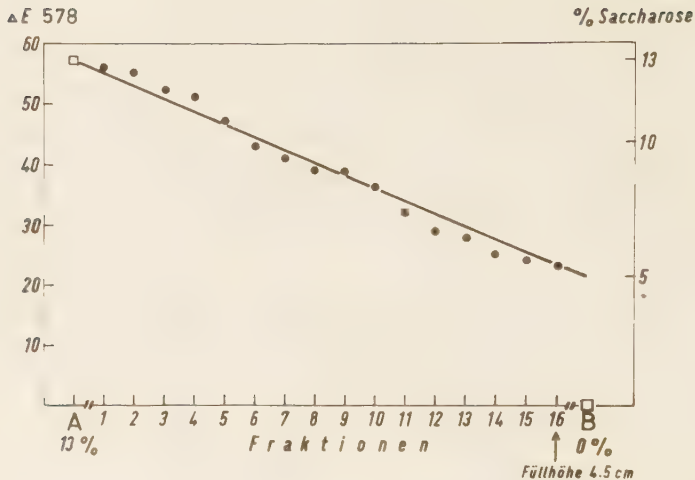


Abb. 3: Prüfung der Linearität von Saccharosedichtegradienten durch Zusatz von Nilblausulfat (20,47).

d) Auftragen der Proben auf den Dichtegradienten

Nach Stabilisation wurden die Zentrifugenröhrchen in ein Stativ gestellt und vorsichtig die jeweilige Probe (0.4 ml) mit einer 0.5 ml-Pipette mit langer Spitze aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Probe auf der Oberfläche der Gradientensäule blieb und nicht einbrach.

5) Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Proteinbestimmung im Eluat der Dextran-Gelfiltration und in den Fraktionen des Dichtegradienten wurde modifiziert nach LOWRY durchgeführt (48). Dabei wird die Proteinkonzentration mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (E.MERCK, Darmstadt) photometrisch bestimmt. Für die Eichkurve wurde ein selbst hergestellter Serumprotein-Standard (bis zu Gewichtskonstanz getrocknete, gereinigte Serumproteine) verwendet.

6) Papierelektrophorese (49,50)

Es wurde die Horizontalmethode angewendet. Papierstreifen (Whatman chromatography paper Nr. 1, W. & R. Balston Ltd., England) wurden mit 0.1 M Veronal-Natrium-Puffer pH 8.6 (Elphor, Bender u. Hobein, München-Karlsruhe) angefeuchtet und straff über die Bügel gespannt. Dann wurde mit einer Mikropipette 0.012 ml der jeweiligen Probe auf den Papierstreifen quer zur Papierlänge in einem geraden gleichmäßigen Strich aufgetragen. Die Bügel wurden in die Kammern gestellt, die soweit mit Elphor-Puffer pH 8.6 gefüllt waren, daß der Papierstreifen an beiden Enden in die Flüssigkeit hineinragte. Darauf wurde 2.5 Volt an die Kammern angelegt. Nach 14 Stunden Laufzeit wurden die Streifen getrocknet und mit Amidoschwarz gefärbt (10 Min.), darauf mit dem Elphorentfärber (1 Teil Eisessig, 9 Teile Methanol) 5 mal 10 Min. entfärbt und wieder getrocknet. Nun wurden die Streifen in Paraffinöl (Paraffin und Brom Naphthalin 1 : 1) eingelegt (mindestens 30 Min.) und darauf mit dem Spaltphotometer mit angeschlossenem Extinctionsschreiber (Carl Zeiss, Oberkochen) die Extinktionskurven gezeichnet. Die Pherogramme wurden anschließend planimetrisch ausgewertet.

7) Flüssigkeitsscintillationsspektrometrie (51)

a) Aufbereitung der Proben (52)

Abhängig von der zu erwartenden Impulszahl und des Quencheffektes (bedingt durch Serumfarbstoffe) wurden entweder, wenn nicht anders beschrieben, 1 ml, 0.5 ml bzw. 0.2 ml von den jeweils gesammelten Fraktionen bei der Dextrangelfiltration in ein Zählgläschen überführt (Fa. PACKARD INSTRUMENT, Frankfurt/Main).

Die Zählgläschen wurden sodann in ein Wasserbad gestellt ($+ 50^{\circ}\text{C}$) und die Flüssigkeit durch Sog mittels einer Wasserstrahlpumpe bis zur Trockene eingeengt (Dauer 15 - 30 Minuten), anschließend in jedes Zählgläschen 1 ml Hyaminhydroxyd^R (p - {diisobutylcresoxyethoxyethyl} dimethylbenzylammonium hydroxyd, Packard Instrument Comp., Illinois, USA) hineinpipettiert und die Proben

24 - 48 Stunden (abhängig von der Menge der Trockensubstanz) zum Lösen in einen Trockenschrank gestellt, der auf $+ 50^{\circ}\text{C}$ eingestellt wurde.

Nachdem sich die Trockensubstanz völlig in Hyaminhydroxyd gelöst hatte, wurden 15 ml Scintillationsflüssigkeit zugegeben. Dazu diente Toluol p.a. (Fa. MERCK AG, Darmstadt) als Lösungsmittel, 0.3 g % PPO (2.5 - Diphenyloxazol, Fa. PACKARD) als primärer (3800 Å) und 0.06 g % Dimethyl - POPOP (1.4 - bis- 2 - (4-Methyl-5-Phenyloxazolyl) - Benzol, Fa. Packard) als sekundärer Scintillator (4300 Å) (53,54).

b) Messung der Proben

Die Messung erfolgte als Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie im Tri - Carb Liquid Scintillation Spektrometer System, Fa. PACKARD INSTRUMENT Model 3324. Als optimaler "gain" für Tritium, bei dem später alle Zählungen durchgeführt wurden, wurde 60 % in einem Vorversuch bestimmt. Die Zählzeit richtete sich nach der Impulszahl und wurde so gewählt, daß mindestens 10 000 Impulse gezählt wurden. Da der statistische Zählfehler

$$F = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot 100 \quad (n = \text{Anzahl der Impulse})$$

ist, lag der statistische Fehler der Zählungen bei 1%.

c) Quenchkorrektur und Berechnung der Ausbeute

Die Ausbeute (counting efficiency) ist die Anzahl der gemessenen Impulse pro Minute (IPM) in % der tatsächlichen Desintegrationen pro Minute (DPM) des gemessenen Isotops. Sie ist einerseits abhängig von der Empfindlichkeit des Gerätes, d.h. von den Phototubes und dem Photomultipliersystem, andererseits von den Löscheffekten, die durch die Probenzubereitung in verschiedenem Maße verursacht werden können und die Ausbeute weiterhin beeinträchtigen. Diese Löscheffekte nennt man Quench. Da der Quench von Probe zu Probe verschieden ist, abhängig vom quenachenden Agens (Farbstoff, O_2 etc.), muß man, um die Proben untereinander vergleichen zu können, diesen Faktor korrigieren. Dazu wurde die Internal Standard Methode benutzt. Bei jeder Meßreihe wurden

2 Probenfläschchen, die nur 1 ml Hyamin und 15 ml Scintillator enthielten, als Blindwerte mitlaufen gelassen. Nach der 1. Messung wurden sämtliche Proben und die beiden Blindwerte mittels einer automatischen Spritze (Fa. HAMILTON CO., Whittier, Calif., USA) mit 0.02 ml Tritium markiertem Toluol (Fa. PACKARD), entspricht einer Aktivität von 5.54×10^4 DPM $\pm$ 1%, beschickt und wieder gemessen. Die Differenz der Impulse (IPM) der Proben der 1. Messung und der 2. Messung wurde mit der Differenz der Blindwerte beider Messungen verglichen.

Wenn nur Hyamin und O₂ den Quench verursachen würden, müßten beide Werte übereinstimmen. Gelöste Serumproteine stellen aber einen zusätzlichen Quenchfaktor dar, so daß die Zählausbeute in Proben mit gelöstem Protein geringer ist. Die Minderung der wiedergefundenen Aktivität des eingesetzten Tritium Toluols (= Internal Standard) ist ein Maß des vorliegenden Quenches. Als Korrekturfaktor wurde für jede Probe der Quotient

$$F = \frac{\text{IPM des Internal Standards der Blindwerte } (*)}{\text{IPM des Internal Standards der Probe}}$$

ermittelt. Mit diesem Faktor (nicht größer als 1.2) wurden die IPM der 1. Messung nach Abzug des Blindwertes multipliziert.

Die Ausbeute für Tritium in unserem System (1 ml Hyamin und 15 ml Toluol-PPO - POPOP) berechnete sich aus dem Quotient

$$\begin{aligned} A &= \frac{\text{IPM}^{+)} \{0.02 \text{ ml } ^3\text{H Toluol} + 1 \text{ ml Hyamin} + 15 \text{ ml Scintillator}\} \times 100}{\text{DPM } (0.02 \text{ ml } ^3\text{H - Toluol})} \\ &= \frac{7634 \cdot 100}{55400} \\ &= 13.8 \%. \end{aligned}$$

d) Berechnung der Wiederfindequote der eingesetzten Radioaktivität

Wenn nicht anders beschrieben, wurden 0.1 ml des zu chromatographierenden Inkubationsgemisches in einem Probenfläschchen eingengt und zur Flüssigkeits-scintillationsspektrometrie aufbereitet. Die Impulse pro Minute (IPM₁) multipliziert mit einem Korrekturfaktor für das Volumen (f₁) ergab die eingesetzte Gesamtaktivität.

$$+) \bar{x} = 7634 \text{ IPM } (n = 20)$$

Die Zählungen der einzelnen Proben (IPM_2) wurden durch Multiplikation mit einem Faktor (f_2) auf die Gesamtmenge der Fraktion umgerechnet. Die so ermittelten Impulszahlen aller Fraktionen wurden addiert. Die Wiederfindenquote (%) errechnete sich aus

$$\frac{\sum IPM_2 \cdot f_2 \cdot 100}{IPM_1 \cdot f_1} = Wf_q (\%)$$

f_1 und f_2 sind also jeweils abhängig von der Menge der eingeengten Substanz und der gesammelten Fraktion.

8) Hypophysektomie bei der Ratte auf parapharyngealem Wege

Die Hypophysektomie wurde nach der von FREUD (55) im Handbuch für Biologische Arbeitsmethoden (ABDERHALDEN) beschriebenen Methode ausgeführt. Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 180-250 g verwendet (19-21). Die Ratten wurden in einem kurzen Ätherrausch mit 0.8 ml 2.5 %iger Avertin^R-Lösung pro 100 g Körpergewicht, die intraperitoneal appliziert wurden, narkotisiert. Die Avertinlösung wurde auf folgende Weise bereitet: 2,2,2 - Tribromäthanol USP XVI (Fa. Fluka AG, Buchs) wurde so in Amylenhydrat gelöst, daß eine 100 %ige Lösung vorlag. Durch Verdünnung mit Aqua dest. wurde eine 2.5 %ige Lösung hergestellt, deren Applikation in der oben angegebenen Dosis zu einem von der 2. bis zur 25. Minute dauernden Toleranzstadium führte.

Die Ratte wurde auf den Rücken mit dem Kopf zum Operateur auf ein Holzbrett gelegt und nur mit einem Bändchen um die Schneidezähne festgehalten. Nach dem Hautschnitt links paramedian von der Unterlippe bis kurz oberhalb der Clavicula wurden durch stumpfe Präparation die Halsfascien median durchtrennt und der linke Musculus digastricus dargestellt.

Mit Hilfe eines Binokulamikroskopes (10-fache Vergrößerung, Fa. Leitz, Wetzlar) wurde im nach lateral offenen Winkel des Digastricussehnnenspiegels, cranial von den Maxillargefäßen und dem Ductus submaxillaris, mit Haken und Pincette in die Tiefe gegangen. Lateral lag nun der M. masseter und medial der M. omohyoideus, durch deren Spreizung in Quer- und Längsrichtung der Processus mesopterygoideus sichtbar wurde, der einen wichtigen Orien-

tierungspunkt darstellt. Von ihm aus wurde nach kaudal und medial bis zum Ansatz der Suboccipitalmuskeln stumpf weiterpräpariert. Dort wurde auf die knöcherne Schädelbasis vorgedrungen und die bläulich schimmernde Synchrondrosis spheooccipitalis, von der median ein knöcherner Wulst in sagittaler Richtung auf das Foramen occipitale magnum verläuft, dargestellt. Mit einem zahnärztlichen Kugelbohrer (Nr. 8, Durchmesser 2.8 mm) wurde genau median und nasal von der Synchrondrosis, sodaß diese beim Bohren nicht miterfaßt wurde, die Schädelbasis durchbohrt, wobei die Dura mater basalis unverletzt blieb. Um die Markräume und Sinus der Schädelbasis abzudichten, wurde der Bohrerkopf mit Bienenwachs und Paraffin, gemischt im Verhältnis 3:1, dick bestrichen.

Die Hypophyse wurde dann, nachdem die Dura mater basalis mit einem spitzen, leicht gebogenen Haken eingerissen worden war, mit einer rechtwinklig gebogenen Glaskanüle (Durchmesser des freien Endes etwa 1 mm) mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Danach wurde die Wunde mit Michelklammern (14X3 mm) verschlossen.

Die Vollständigkeit der Hypophysektomie wurde bei Beendigung des Versuches nach Aufklappen des Schädeldaches und Wegräumen des Gehirns durch Inspektion der Schädelbasis verifiziert (40).

9) Arterielle und venöse Katheter bei der Ratte (Abb. 4).

Bei der zweiten Operation der Ratte wurde eine kombinierte Urethan (Merck 84907) - Avertin - Narkose vorgenommen. Im Ätherrausch wurde der hypophysektomierten Ratte 0.8 ml einer 10 %igen Urethanlösung pro 100 g Körpergewicht subcutan und gleichzeitig 0.25 ml pro 100 g Körpergewicht der 2.5 %igen Avertinlösung intraperitoneal injiziert. Es ergab sich ein Toleranzstadium, das von der zweiten Minute an mehrere Stunden anhält.

Auf dem Rücken, mit dem Schwanz zum Operateur, lag die Ratte auf einem Holzbrett, beide Hinterpfoten daran fixiert. In der linken Fossa inguinalis wurde ein zehnpfennigstückgroßes Hautstück entfernt und mit Hilfe des Bino-kulamikroskopes das femorale Gefäßnervenbündel distal vom ligamentum

inguinale so präpariert, daß Arterie und Vene frei lagen. Ebenso wurde auch die rechte V. femoralis freigelegt. Mit gewöhnlicher Nähseide wurden dann an beiden Gefäßen Ligaturen angebracht. Die distale Ligatur der A. femoralis wurde zugezogen und am Operationstisch befestigt. Nun wurde die proximale Ligatur angespannt, wodurch das Gefäß abgeknickt wurde und eine größere Blutung während der Eröffnung des Gefäßes mit einer Stahlkanüle No. 14 verhindert wurde. Der Arterienkatheter (Größe OR, Braun-Melsungen, äußerer Durchmesser 0.46 mm), als Mandrin diente ein feiner Kupferdraht, wurde etwa 7-8 cm vorgeschoben und lag so in der Aorta thoracica sicher über dem Abgang der Nebennierenarterien. Jetzt wurde auch die proximale Arterienligatur zugezogen und somit der arterielle Katheter fixiert. Nach Entfernen des Mandrins wurde eine Tuberculinspritze an den Katheter angeschlossen und der Ratte 50 I.E. Heparin (Vertren^R) pro 100 g Körpergewicht appliziert, um ein Verstopfen des Katheterlumens durch Gerinnungsvorgänge zu verhindern. Bei dem Vertren^R handelt es sich um eine Heparinpräparation, die frei von Benzylalkohol ist und somit bei der Fluoreszenzmessung nicht stört (56), was wir durch Fluoreszenzmessung verschiedener Vertren^R-Konzentrationen zeigen konnten (57). Das gleiche gilt für Liquemin^R, mit dem die Glasspritzen für die Blutentnahme zur ACTH-Bestimmung im Plasma (s. Seite 22) benetzt wurden.

Die V. femoralis wurde unter Zug an der distalen Ligatur mit einer spitzen Scherenbranche eröffnet. Dann wurde ein Clay-Adams-Katheter PE (äußerer Durchmesser 0.61 mm, Fa. Vogel, Gießen) in die Vene vorgeschoben und die distale Ligatur zugezogen.

In die V. femoralis dextra wurde auf die gleiche Weise ein kurzer aus Polyvinylchloridschlauch selbstgefertigter Katheter eingeführt, dessen äußeres Ende so gefommt war, daß es den linken venösen Katheter aufnehmen konnte.

Mit einem Medianschnitt längs der Linea alba wurde dann der Bauch eröffnet. Magen und Milz wurden nach kranial, Dünn- und Dickdarm zur linken Seite luxiert, um die V. cava, V. renalis und V. suprarenalis freizulegen. Der Katheter in der V. femoralis sinistra wurde soweit vorgeschoben, daß man ihn

in der V. cava mit einer Pinzette fassen konnte, und in die V. renalis und von dort in die V. suprarenalis führen konnte. Die Eingeweide wurden jetzt reponiert und das eröffnete Abdomen mit feuchtem Zellstoff abgedeckt. Nach dem Versuch wurde die richtige Lage der Katheter noch einmal überprüft.

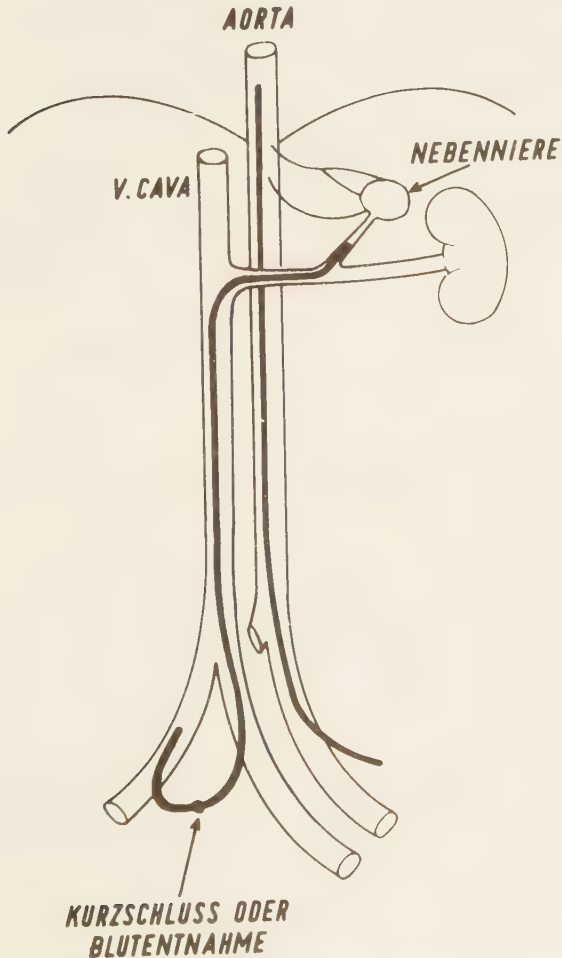


Abb. 4 : Schematische Darstellung der Lage der Katheter bei der Ratte.
(19,20). Erklärung siehe Text.

10) Sammeln des Nebennierenvenenblutes und fluorimetrische

Corticosteronbestimmung im Plasma der Ratte

Das Blut, das in Tropfen aus dem Venenkatheter abfloß, wurde in Wintrobe Haematokritröhrchen aufgefangen und bei $1500 \times g$ 15 Min. zentrifugiert. Dabei entsprach die Füllung bis zur Marke 10 einer Haematokriteinheit (HKE = 0.75 ml). Das Plasma der Probe wurde mit einer V_2A Kanüle in eine Tuberkulinspritze aufgezogen und mit Aqua dest. bis auf 0.5 ml aufgefüllt. Diese 0.5 ml wurden in ein Zentrifugenglas (Fassungsvermögen = 25 ml) gespritzt und die Tuberkulinspritze noch einmal mit 0.5 ml Aqua dest. gespült, die wiederum in das Zentrifugenglas gespritzt wurden. Zur Corticosteronbestimmung lag also ein Ausgangsvolumen von 1 ml vor. Nachdem die Zentrifugengläser mit Hochdruckpolyäthylenstopfen verschlossen waren, wurden sie bis zur Corticosteronbestimmung bei -18°C aufbewahrt.

Die Haematokritröhrchen wurden jeweils mittels einer langen Kanüle mehrmals gespült und sorgfältig mit einer Bürste gereinigt und im Trockenschrank getrocknet ($\pm 120^\circ\text{C}$).

Zur Corticosteronbestimmung wurde die Methode von ZENKER und BERNSTEIN (18) angewandt, wobei wir allerdings die angegebenen Volumina änderten (21, 40). Bei der Fluoreszenzmessung befolgten wir die von PFEIFFER et.al. (58) angegebene, auf das Fluoreszenzzusatzgerät des Photometers Eppendorf (Fa. Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) zugeschnittene Methode.

Als Reagenzien wurden benötigt: Aethylalkohol p.a. (Merck), konzentrierte Schwefelsäure (93 - 97 %, p.a. Merck), Chloroform p.a. (Merck) und 0.1 N NaOH. Das Fluoreszenzreagens bestand aus 2.4 Volumenteilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Volumenanteil Aethylalkohol (50 %). Für die Corticosteroneichkurven diente eine Grundstandardlösung von 100.0 mg Corticosteron (Fa. Fluka AG, Buchs, 52397) in 200.0 ml Aethylalkohol.

Davon wurde 1.0 ml in 100.0 ml Aethanol gegeben, so daß $5 \mu\text{g}$ Corticosteron pro ml in diesem Arbeitsstandard vorlagen. Durch Verdünnung mit destilliertem Wasser wurde aus diesem Arbeitsstandard jeweils ein Eichwert mit $0.2 \mu\text{g}$ pro ml hergestellt.

Der Eichwert, ein Wasserwert und die auf 1 ml verdünnten Plasmaproben wurden mit 15.0 ml Chloroform extrahiert. Die Proben wurden 10 Sekunden mit dem Rotamixer (Fa. Hock & Tucker, Ltd.) geschüttelt und dann 15 Min. bei $850 \times g$ zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit einer schräg angeschliffenen V_2A Kanüle mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und dem Chloroformextrakt 1.5 ml 0.1 N NaOH zum Waschen zugegeben. Es wurde wieder geschüttelt und 15 Min. bei $850 \times g$ zentrifugiert und nachher die wässrige Phase abgesaugt. Danach wurde die Chloroformphase in zwei 6 ml Portionen geteilt und jeweils in ein 15 ml fassendes Spitzröhrchen überführt, um Doppelbestimmungen durchführen zu können. Zu jeder Probe wurde 3.0 ml Fluoreszenzreagens gegeben und 10 Sekunden geschüttelt und 15 Min. zentrifugiert ($850 \times g$). Danach wurde die obenaufstehende Chloroformphase mit einer gerade abgeschnittenen V_2A Kanüle abgesaugt und die Proben in Spiegelglaskuvetten (OS, 1 cm Schichtdicke) umgegossen. Die Proben wurden zwei Stunden stehen gelassen und dann in der Reihenfolge der Zugabe von Fluoreszenzreagens gemessen.

Beim Fluoreszenzzusatzgerät zum Photometer Eppendorf wurde von uns ein Primärfilter von 405–436 nm und ein Sekundärfilter von 500–3000 nm benutzt. Die Eichung erfolgte mit einem Standard für grünes Licht (Nr. 5816), dessen fluoreszierende Fläche mit Tusche geschwärztem Papier bis auf etwa 2 mm^2 abgedeckt war.

Bei der Fluoreszenzmessung wird die Lichtemmission quantitativ erfaßt. Diese ist linear proportional der Anzahl der fluoreszenzanregenden Teilchen, solange z.B. keine Fluoreszenzlöschung vorliegt (59). Die Ablesung der Strahlungsintensität der einzelnen Proben erfolgte auf einer linearen Skala von 0–100 % Durchlässigkeit. Wurde die Durchlässigkeit von 100 % überschritten, so wurde die Stufenschaltung des Photometers benutzt. Diese ist der logarithmischen Funktion der Extinktionsskala gekoppelt. Dabei entspricht jede Stufe einer Extinktion von $E = 0.25$. Zur Umrechnung gilt:

$E = \log \frac{I_0}{I}$ (LAMBERT-BEERsche Gleichung), wobei $I_0 = 100$ % Durchlässigkeit und I = Durchlässigkeit der Probe. Dann ist

$$\frac{100}{I} = 10^E \quad \text{und} \quad I = 10^{2-E} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Jetzt wird mittels der Stufenschaltung (Subtraktion von 0.25) der negative E-Wert abgelesen und dieser in die Gleichung 1 eingesetzt. Die Durchlässigkeit in % ergibt der Numerus von 2 - E.

11) Gewinnung von menschlichem Plasma

Die Blutentnahme wurde um 6 Uhr vorgenommen. Der Bulbus cranialis venae jugularis wurde unter Lokalanästhesie mit einer 6 cm langen Stahlkanüle mit Mandrin punktiert (19-21). Zehn Minuten nach Punktion wurde aus dem Bulbus und der Vena femoralis, bzw. V. cubitalis, die erst dann punktiert wurde, 20 ml Blut mit Liquemin^R (s. Seite 18) benetzten Glasspritzen abgenommen. Nach weiteren 10 Minuten erfolgte eine erneute Blutabnahme. Das Blut wurde in 10 ml fassende Polyamid Zentrifugengläser gegeben, auf Eis gebracht und sofort in einer Kühlzentrifuge (MSE High Speed 18) bei +2° C 10 Min. bei 1500 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend in 2.0 ml Fraktionen aufgeteilt und bei -18° C aufgehoben.

12) ACTH-Bestimmung

90 Minuten nach Hypophysektomie der Ratte wurde 8 Minuten lang Blut aus der Nebennierenvene gesammelt, um den Basiscorticosteronspiegel zu erfassen. Unmittelbar anschließend wurde die ACTH-Eichdosis (0.043 mE in 1.0 ml enthalten) in 95 Sekunden intraarteriell infundiert (Spritze Ultra-Sept, Perfusor, Fa. Braun, Melsungen).

3 Minuten nach Beginn der Infusion wurde wieder 8 Minuten lang Nebennierenvenenblut gesammelt, um den Corticosteronanstieg zu messen. Danach wurde der Katheter mit dem rechten Vena femoralis-Katheter kurz geschlossen, um Blutverluste zu vermeiden. Nach 9 Min. wurde wieder 8 Min. gesammelt, um zu prüfen, ob der Corticosteronspiegel wieder auf Basiswerte abgesunken war. Unmittelbar darauf erfolgte die intraarterielle Infusion von 1.0 ml der Probe mit unbekanntem ACTH-Gehalt. Drei Minuten später wurde nochmals 8 Minuten lang gesammelt. Alle infundierten Proben wurden erst unmittelbar vor Infusion aufgetaut. Im so gesammelten Blut wurde der Plasmacorticosteronspiegel bestimmt. Davon wurde bei sämtlichen Corticosteronwerten die aus dem zugehörigen Plasmavolumen berechnete Basisfluoreszenz vom Plasma

hypophysektomierter Ratten (21) abgezogen ($0.001 \mu\text{g}$ Corticosteron pro 0.02 HKE). Anschließend wurde der vor jeder ACTH-Applikation gemessene Basiswert der Corticosteroninkretion von dem Corticosteronwert nach ACTH-Infusion subtrahiert. Auf diese Weise wurde der echte Corticosteronanstieg ermittelt. Die ACTH-Aktivität einer unbekannten Probe wurde an Hand des Corticosteronanstiegs mittels einer Eichkurve für β^{1-23} Corticotropin-23-amid abgelesen. Die Eichkurve (Versuche von F. KLUGE, 21) stellt die Relation zwischen den verschiedenen applizierten ACTH-Dosen und den dazugehörigen Corticosteronanstiegen pro 8 Minuten im Nebennierenvenenblut dar (Abb. 5).

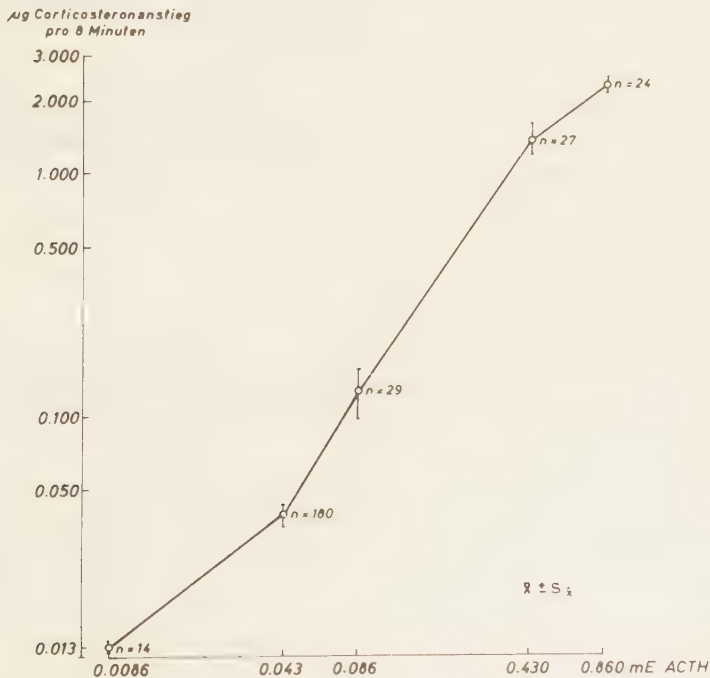


Abb. 5: Eichkurve für β^{1-23} Corticotropin-23-amid. Abszisse: gegebene ACTH-Dosis, Ordinate: Anstieg der Corticosteroninkretion im Nebennierenvenenblut der hypophysektomierten Ratte. Angegeben sind die Mittelwerte ($\bar{x}$) und deren Standardabweichung ($S_{\bar{x}}$). An Hand dieser Eichkurve wurden die in dieser Arbeit mitgeteilten ACTH-Plasma- und Tumor-Konzentrationen abgelesen. Aus F. KLUGE (21).

13) A C T H - Extraktion aus Geweben (60,61)

Wenn nicht anders beschrieben, wurden 2 g Gewebe mit 10 ml Eisessig versetzt und mit dem Ultra Turrax (Fa. Janke & Kunke KG, Staufen i.Br.) 5 mal 10 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde in Teflonröhrchen bei $+2^{\circ}\text{C}$ 90 Min. lang bei 105 000 x g zentrifugiert (Rotor Nr. 40 in der Spinco Model L Ultrazentrifuge). Der Überstand (ca. 8 ml) wurde danach in Polyamidzentrifugenröhrchen gegeben (4 ml je Zentrifugenröhrchen) und mit dem gleichen Volumen Diaethyläther versetzt. Es wurde mit der Hand gut durchgeschüttelt und dann in einer Kühlzentrifuge (MSE High Speed 18) bei $+2^{\circ}\text{C}$ 10 Min. lang bei 1500 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Sediment mit 3 ml 0.01 M Na-phosphatpuffer pH 7.4 versetzt und wieder 3 mal 10 sec. mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde auf eine 6 cm hohe albuminisierte Dextrangelsäule (Sephadex G - 25 fine) gegeben und dann in üblicher Weise eluiert: erst mit Puffer und darauf mit 0.1 N HCL nachgewaschen. Sowohl das Puffereluat, als auch das HCL-Eluat wurden bis zur ACTH-Bestimmung in 2 ml Fraktionen bei -18°C eingefroren.

14) Immunisieren von Meerschweinchen mit A C T H

Bei Beginn der Immunisation wogen die Meerschweinchen 200 - 250 g (Männchen und Weibchen). Sie wurden zuerst wöchentlich einmal mit 6 IE Schweine-ACTH (ca. 0.05 mg hochgereinigtes ACTH-Peptid) in 1.0 ml 0.9 % NaCl und Freund's Adjuvant (Hylan Laboratories, Calif., USA) im Verhältnis 1 : 1 gespritzt. Die ACTH-Kochsalzlösung wurde unmittelbar vor Applikation 50 Min. mit dem Freund's Adjuvant bei $+2^{\circ}\text{C}$ durchgeschüttelt, um die Phasentrennung aufzuheben. Um Antikörper hemmende Cortisolproduktion zu unterdrücken, wurde den Tieren dazu noch 100 mg Metopiron (Fa. Ciba AG, Basel) s.c. appliziert (28). Da die Tiere das Metopiron sehr schlecht vertrugen (Nekrosen an der Injektionsstelle, Lähmungen an den Hinterpfoten), wurde die Metopirongabe wieder abgesetzt. Insgesamt wurde 10 mal 6 IE Schweine-ACTH (Cortrophine^R) gegeben.

Einem zweiten Kollektiv wurden im 8 - 9 Tage-Intervall 25 IE Schweine-ACTH (ca. 0.2 mg hochgereinigtes ACTH-Peptid) + 0.5 ml Freund's Adjuvant (Gesamtvolumen 1 ml) s.c. appliziert. Insgesamt wurden 10 Injektionen vorgenommen.

15) Gewinnung von Meerschweinchen-Plasma

10 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren Blut abgenommen. Dabei wurde im Ätherrausch mit einem 2 - 3 cm langen Sagittalschnitt am Hals die V. jugularis freigelegt. Mittels einer Kanüle (No. 2) wurde die V. jugularis punktiert und etwa 4.0 ml in einer Rekordspritze aufgezogen. Das Blut wurde 5 Min. bei $850 \times g$ zentrifugiert und darauf das überstehende Plasma im Verhältnis 1 : 5 mit 0.9 % NaCl verdünnt. Das verdünnte Plasma wurde in 1.5 ml Fraktionen bis zur Verwendung bei $-18^{\circ}C$ eingefroren.

ERGEBNISSE

1.) Vorversuche

A. Orientierender Vorversuch zur Proteinbindung von ACTH

Ein IE ungereinigtes ^3H - ACTH (spezif. Aktivität 212 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) in einem Volumen von 0.1 ml 0.9 % NaCl wurde auf eine nicht albumingesättigte Säule ($h=15$ cm) gegeben. Mit Hilfe der "Chromatopart"-Technik (s. METHODEN) wurden 25 Fraktionen à 5 ml gesammelt. Eluiert wurde zuerst mit 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.4. Nach 8 Fraktionen wurde die Pufferelution unterbrochen, der über der Säule stehende Puffer abgesaugt und 2 ml Normalserum auf die Säule gegeben. Nachdem das Serum in das Gel eingesickert war, wurde wiederum mit Puffer eluiert. Nach der 12. Fraktion wurde nochmals 2 ml Serum auf die Säule gegeben und darauf die Pufferelution bis zur 17. Fraktion fortgeführt. Anschließend wurde die Säule an ein Vorratsgefäß mit 0.05 M Essigsäure in 0.9 % NaCl angeschlossen und 8 weitere Fraktionen gesammelt. 0.5 ml je Fraktion wurden zur Flüssigkeitsszintillationszählung aufbereitet. Dabei betrug die errechnete Wiederfindequote 104 %. In den Fraktionen 8 - 13 wurden Proteinbestimmungen durchgeführt. Schließlich wurde in den Fraktionen 2, 10, 14 und 19 die biologische ACTH-Aktivität bestimmt (Bestimmungen zusammen mit F. KLUGE).

Wie die Abbildung zeigt, ergaben sich bei diesem Versuch 4 getrennte Radioaktivitätsgipfel. Der erste, die unspezifische Radioaktivität enthaltend, wies nahezu keine biologische ACTH-Aktivität auf; die beiden folgenden, bedingt durch die Serumelution, und der letzte, bedingt durch die Essigsäureelution, enthielten alle drei biologische ACTH-Aktivität. (Abb. 6).

B. Säulenchromatographische Reinigung von ^3H - ACTH

Um die radioaktiven Verunreinigungen ohne biolog. Aktivität von dem markierten Hormon zu trennen, wurden 1 IE in 0.1 ml 0.9 % NaCl auf eine nicht albuminisierte Säule gegeben. Zuerst wurde mit Puffer eluiert, darauf mit 0.05 M Essigsäure in 0.9 % NaCl. Die Wiederfindequote (Wfq) betrug jetzt nur noch 13.8 % (s. METHODEN).

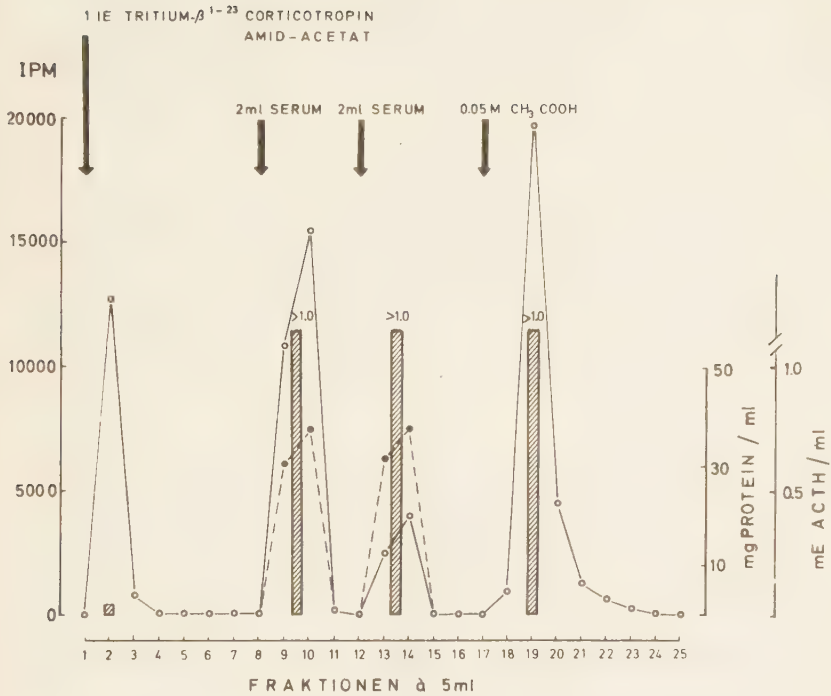


Abb. 6: Dextrangelfiltration von 1 IE ungereinigtem $^3\text{H}-\beta^{1-23}$ Corticotropin-23-amid-acetat. Es wird zweimal mit 2 ml Serum nachgewaschen und anschließend mit 0.05 M Essigsäure eluiert. IPM (o—o), Protein (●—●), biolog. ACTH-Aktivität (Säulen).

Wurde die Säule vorher mit 4 ml Serum abgesättigt, erhöhte sich die Wfq bei gleicher Elution auf 33 %. Nach Absättigung der Säule mit 4 ml Rinderalbuminlösung (3.2 g %) und Elution mit Puffer und darauf mit 0.01 N HCl ergab sich eine Wfq von 66 %. Wurde mit 0.1 N HCl an Stelle von 0.01 N HCl eluiert, so wurde bei 55 Versuchen eine Wfq von $95 \pm 7.6 \% (\bar{x} \pm s)$ erreicht (entspricht einer Präzision, VK = $\frac{s}{\bar{x}} = 8 \%$).

Im folgenden Versuch (Abb. 7) wurden 5 IE ungereinigtes ^3H -ACTH in 0.5 ml 0.9 % NaCl über eine mit 3 ml 5 % Humanalbuminlösung abgesättigte Säule ($h = 15$ cm) gegeben. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt. Davon wurden je 0.5 ml zur Flüssigkeitsszintillationszählung aufbereitet. In den Fraktionen 2 und 9 wurde die biolog. Aktivität bestimmt. Wie die Abbildung zeigt, befindet sich die biolog. ACTH-Aktivität allein im Säureeluat.

Um größere Mengen gereinigtes ^3H -ACTH zu erhalten, wurden 2 mg ^3H -ACTH in 10 ml 0.9 % NaCl gelöst. Davon wurde 1 ml (= 20 IE ACTH) auf eine albuminierte Säule gegeben. Mit Hilfe der Batchtechnik wurde es so eingerichtet, daß 20 ml Puffereluat und darauf folgend 20 ml 0.1 N HCl - Eluat in jeweils einem graduerten Röhrchen mit Schliff aufgefangen wurden. Da mit den ersten 20 ml (Puffereluat) die unspezifische, nicht biologisch wirksame Radioaktivität eluiert wurde, und sich in der zweiten Fraktion die biolog. ACTH-Aktivität befand, hatten wir im zweiten Batch 1 IE gereinigtes ^3H -ACTH pro 1.0 ml 0.1 N HCl vorliegen.

Um die Reinheit des gereinigten ^3H -ACTH zu prüfen, wurden 0.1 ml (= 100 mE ACTH) des 0.1 N HCl-Eluats nach Reneutralisation mit 0.01 ml 1 N KOH rechromatographiert. (Abb. 8). Die Abbildung zeigt einen homogenen Gipfel, bedingt durch die Salzsäureelution, der bei der biologischen Bestimmung ACTH-Aktivität zeigte. Die radioaktiven Verunreinigungen betrugen 4 % der Gesamtaktivität. Die Rechromatographie von 1 ml Puffereluat (Abb. 9) ergab ebenfalls einen homogenen Gipfel, bedingt durch die Pufferelution. Die anschließende Salzsäure-Elution hatte erwartungsgemäß keinen erneuten Anstieg der Radioaktivität zur Folge.

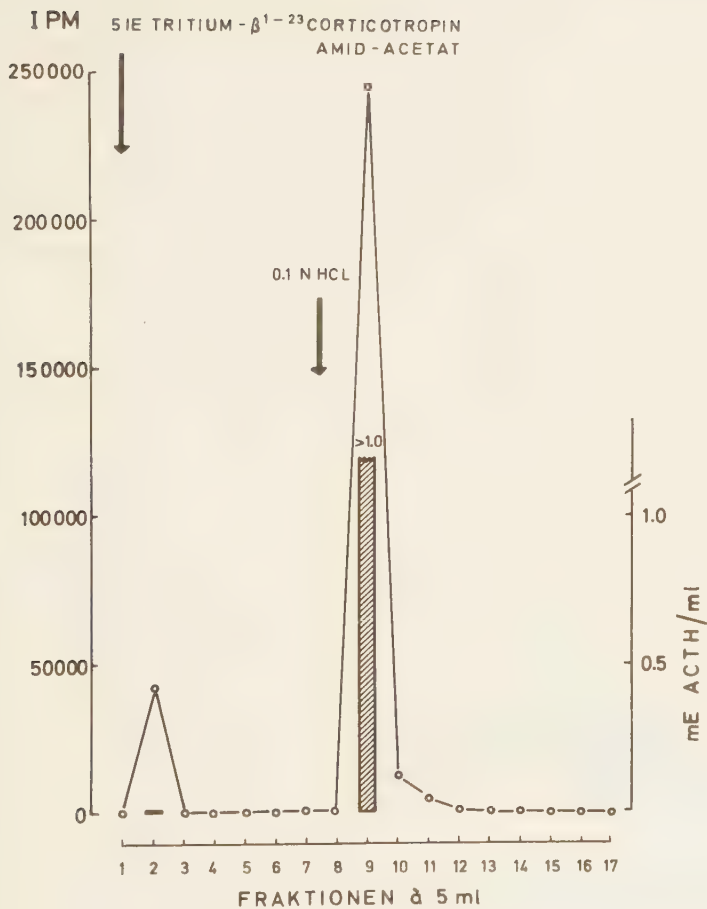


Abb. 7: Dextrangelfiltration von 5 IE ungereinigtem ^3H -ACTH

IPM (o—o); biolog. ACTH-Aktivität (Säulen). Die unspesz. Radioaktivität ohne biolog. ACTH-Aktivität erscheint in der zweiten Fraktion. Das biologisch wirksame ^3H -ACTH wird ausschließlich durch die 0.1 N HCL eluiert.

Abb. 8: Rechromatographie von
100 mE gereinigtem ^3H -ACTH.

IPM (○—○), biolog. ACTH-
Aktivität (Säulen)

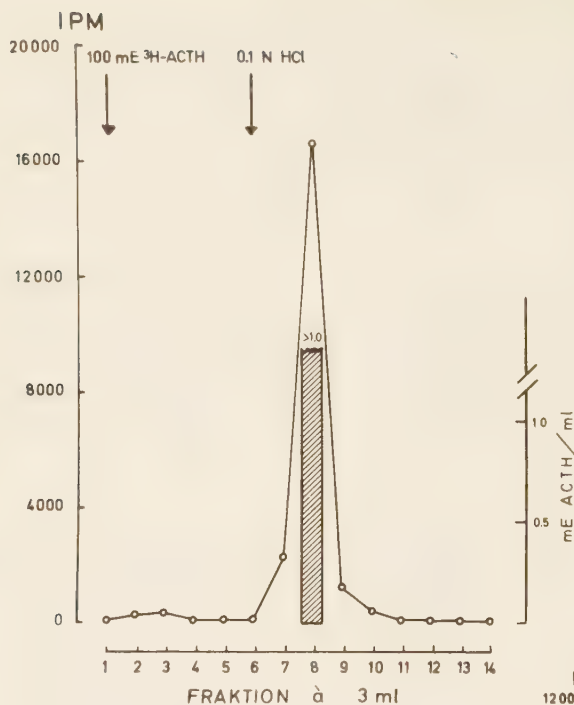
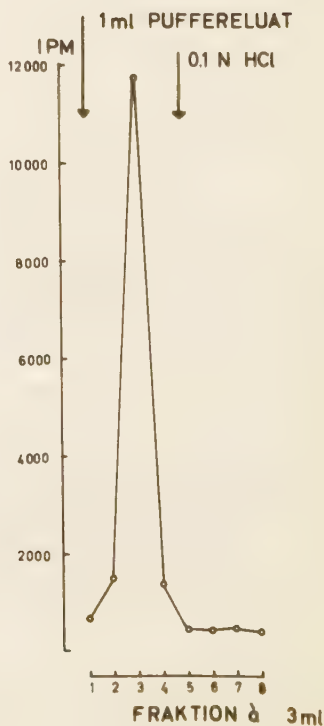


Abb. 9: Rechromatographie von 1 ml Puffereluat
(= unspez. Radioaktivität ohne biolog.
ACTH-Aktivität). Nach Elution mit
0.1 N HCl erfolgt kein erneuter Anstieg
der Radioaktivität



C. Stabilität des $^3\text{H} - \beta^{1-23}$ Corticotropin-23-amid-acetat (Substanz, Lösungen)

Das $^3\text{H} - \beta^{1-23}$ -Corticotropin-23-amid-acetat wurde bei uns in Pulverform bei -18°C gelagert. Zur Reinigung wurden wie beschrieben 2 mg in 10 ml 0.9 % NaCl gelöst und chromatographiert. Die unspezifische Radioaktivität wurde bei der Dextran-gel Säulenchromatographie mit 0.01 M Na-Phosphatpuffer eluiert. Sie lag zu Beginn unserer Versuche bei 15 %. Sie ließ sich ermitteln, indem die IPM des Puffereluats mit 100 multipliziert durch die Gesamtaktivität (IPM des Puffereluats + IPM des HCl-Eluats) geteilt wurden. Im Verlauf von 8 Monaten nahm die unspezifische Radioaktivität nahezu linear bis 65 % der Gesamtaktivität zu (Abb. 10).

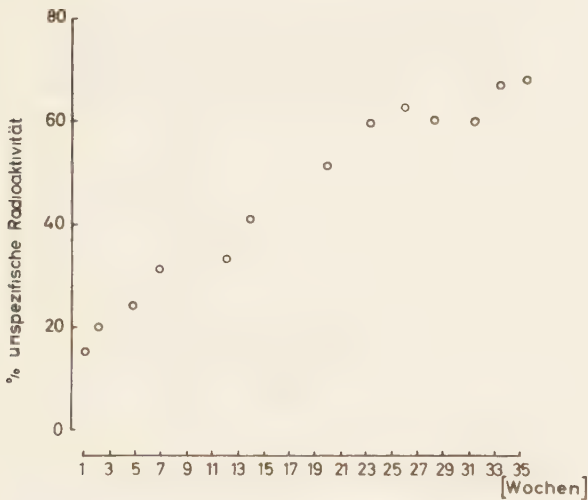


Abb. 10: Zunahme der unspezifischen Radioaktivität ohne biologische ACTH-Aktivität des $^3\text{H} - \beta^{1-23}$ Corticotropin-23-amid-acetat in Substanz, ermittelt durch Dextrangelfiltration (siehe Text)

Das durch Chromatographie gereinigte ^3H -ACTH lag in einer 0.1 N HCl-Lösung vor (1 IE/ml). 1 ml davon wurde nach Reneutralisation mit 1 N KOH unmittelbar nach der präparativen Reinigungschromatographie rechromatographiert. Dabei zeigte sich wie beschrieben noch eine unspezifische Radioaktivität von 3 - 4 %. Der Rest der ^3H -ACTH-Lösung (0.1 N HCl) wurde bei -18°C fraktioniert eingefroren. Im Verlauf von mehreren Tagen wurden die Fraktionen aufgetaut, mit 1 N KOH auf annähernd pH 7 gebracht (Kontrolle mit Universalindikatorpapier, E.MERCK) und chromatographiert. Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils der unspezifischen Aktivität an der Gesamtaktivität (Abb. 11). Die Zunahme der unspezifischen Radioaktivität ohne biolog. ACTH-Aktivität beruht einerseits wahrscheinlich auf der Abspaltung des Tritiums vom Phenolring des Tyrosins und andererseits vom Zerfall des Moleküls selbst, ausgelöst durch die radioaktiven Zerfälle (radiochemische Zersetzung).

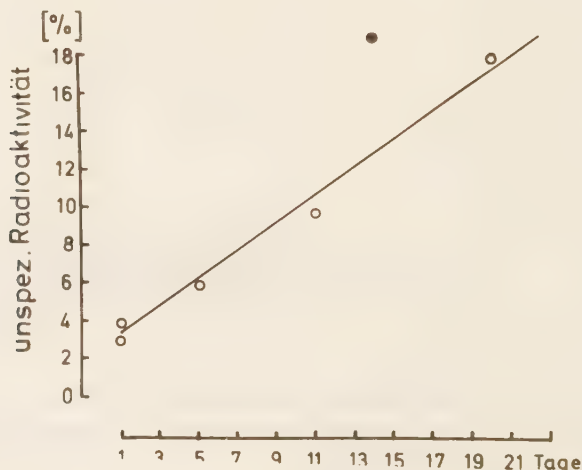


Abb. 11: Zunahme der unspez. Radioaktivität ohne biolog. ACTH-Aktivität des ^3H -ACTH in Lösung.

Das ^3H -ACTH wurde in 0.1 N HCl bei -18°C aufgehoben (o), bei Zimmertemperatur (●).

2) Bindung von ACTH an Serumproteine

A) Dextrangelfiltration:

250 mE Schweine-ACTH (Cortrophine^R) in 1 ml 0.9 % NaCl wurden auf eine albuminisierte Dextrangelsäule (h = 15 cm) gegeben. Es wurde zuerst mit 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.4 eluiert. Am Ende der 2. Fraktion wurde die Pufferelution unterbrochen, der über der Säule stehende Puffer abgesaugt und 2 ml Normalserum auf die Säule gegeben. Nachdem das Serum eingesickert war, wurde die Pufferelution fortgesetzt. Am Ende der 5. Fraktion wurde die Pufferelution wiederum unterbrochen und nochmals mit 2 ml Normalserum nachgewaschen. Anschließend wurde mit Puffer weitereluiert. Nach der 8. Fraktion wurde die Säule an das 0.1 N HCl-Vorratsgefäß angeschlossen. Mit Hilfe der "Chromatopart"-Technik wurden 11 Fraktionen à 5 ml gesammelt. In allen 11 Fraktionen wurde der Proteingehalt (LOWRY) und das pH bestimmt. Ebenso wurde in allen Fraktionen die biolog. ACTH-Aktivität ermittelt. Dabei ergaben die Fraktionen 3, 6, 7 und 10 bei unserer biologischen ACTH-Bestimmung an der hypophysectomierten Ratte jeweils eine maximale Stimulierung der Corticosteroninkretion. Es zeigte sich also, daß ein Teil der biologischen Aktivität von extraktiv gewonnenem ACTH (Cortrophine^R) durch Serumproteine eluiert wurde, wie das für synthetisches ³H-ACTH in den Vorversuchen schon gezeigt wurde. Ebenso befand sich, analog zu den Vorversuchen mit markiertem β^{1-23} -Peptid, nach zweimaligem Nachwaschen mit 2 ml Serum noch biologisch aktives ACTH an Dextrangel gebundenen auf der Säule, welches erst durch 0.1 N HCl eluiert werden konnte. (Abb. 12)

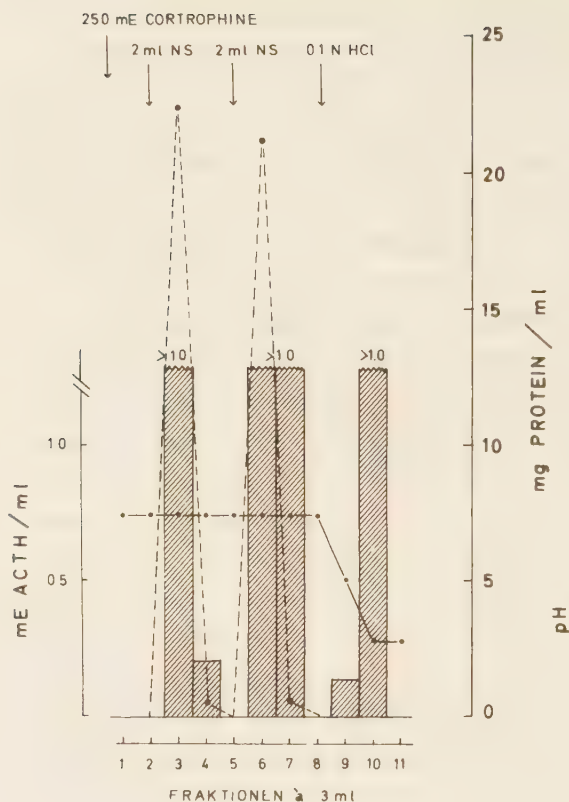


Abb. 12: Dextrangelfiltration von 250 mEq Schweine-ACTH (Cortrophine^R)

Zweimaliges Waschen der Säule mit Normalserum. Anschließend Elution mit 0.1 N HCl. Biologische ACTH-Aktivität (Säulen), Protein (● - - ●), pH (● - ●).

Im folgenden Versuch wurden 200 mEq gereinigtes Tritium markiertes β^{1-23} Corticotropin-23-amid-acetat mit 2.0 ml Normalserum inkubiert. (Tab. 1)

Tab. 1: Inkubationsansatz für ^3H - ACTH und Serumprotein ($\sum V = 4.0 \text{ ml}$)

^3H -ACTH (gereinigt)	200 mE in 0.2 ml 0.1 N HCl
0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.4	0.6 ml
0.9 % NaCl	1.2 ml
1 N KOH ad pH 7.5 ^{†)}	0.008 ml
Normalserum	2.0 ml
Inkubation:	3 Min. bei + 37°C

†) Kontrolle mit Universalindikatorpapier (E.MERCK, Darmstadt)

Davon wurden 2.0 ml (also 100 mE ^3H -ACTH mit 1.0 ml Serum in einem Gesamtvolumen von 2.0 ml 0.0015 M Na-Phosphatpuffer pH ~ 7.5) auf eine Albumin gesättigte Dextrangelsäure ($h = 8.5 \text{ cm}$) gegeben. Darauf wurde zuerst mit Puffer, anschließend mit 0.1 N HCl eluiert. Es wurden 12 Fraktionen à 3 ml gesammelt. 0.5 ml je Fraktion wurden zur Flüssigkeitsszintillationszählung aufbereitet. Dazu bestimmten wir in den ersten drei Fraktionen den Proteingehalt nach LOWRY und in der 2. und 9. Fraktion die biologische ACTH-Aktivität. Wiederum zeigte sich, daß ein Teil des ^3H -ACTH an Serumprotein gebunden mit dem Protein zusammen eluiert wurde. Der freie, bzw. Dextrangel gebundene Teil wurde durch 0.1 N HCl eluiert. Bemerkenswert war, daß die biologische Aktivität des proteingebundenen ACTH geringer war, als man an Hand der IPM vermuten durfte. (Abb. 13).

In den folgenden Experimenten sollte die Beziehung von dextrangelgebundenem und serumgebundenem ^3H -ACTH untersucht werden. Es wurden 2 ml des obigen (Tab. 1) Inkubationsgemisches (100 mE ^3H -ACTH + 1 ml Serum in 2.0 ml 0.0015 M Na-Phosphatpuffer pH ~ 7.5 ; Inkubationszeit 3 Min. bei + 37°C) auf Standardsäulen verschiedener Höhe ($h = 1.2 - 18 \text{ cm}$, $r = 0.4$) gegeben. In üblicher Weise wurde zuerst mit Puffer, danach mit 0.1 N HCl eluiert. Dabei ergab sich, daß mit Abnahme bzw. Zunahme der Säulenhöhe der proteingebundene Anteil des ^3H -ACTH (Puffereluat) zunahm, bzw. abnahm. Die Abb. 14 zeigt die Abnahme des proteingebundenen ^3H -ACTH in % der eluierten Gesamtaktivität bei Zunahme der Säulenhöhe. Extrapolation auf 0.0 cm Säulenhöhe führt zu einem Wert von 70 bis 80 % proteingebundenem ^3H -ACTH.

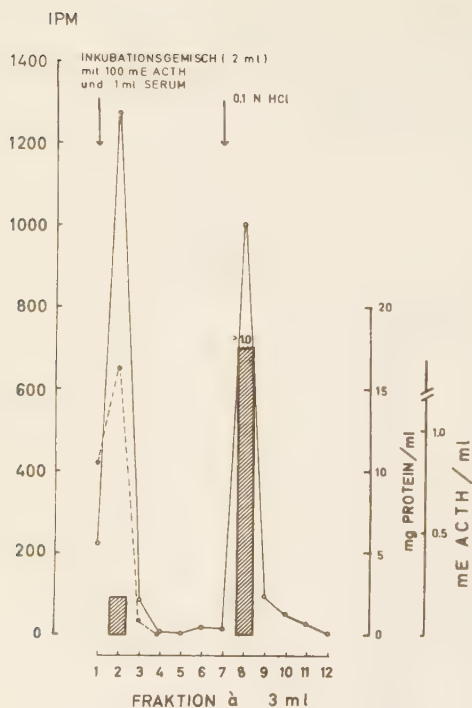


Abb. 13: Dextrangelfiltration von 2.0 ml Inkubationsgemisch (100 mE ^3H -ACTH + 1.0 ml Serum) Säulen - höhe 8.5 cm.

Der größere Teil der Radioaktivität (IPM $\circ - \circ$) des gereinigten ACTH wurde an Protein ($\bullet - \bullet$) gebunden und zusammen mit dem Serum eluiert. Das sogenannte "freie" bzw. dextrangelgebundene ^3H -ACTH wurde durch 0.1 N HCl eluiert. Biologische ACTH-Aktivität (Säulen).

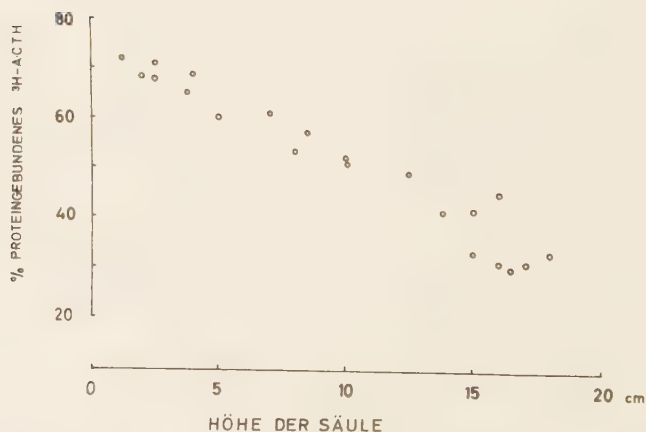


Abb. 14: Einfluß der Höhe der Sephadex G-25 Säule auf den proteingebundenen ^3H -ACTH-Anteil. 100 mE gereinigtes ^3H -ACTH + 1 ml Serum in einem Gesamtvolumen von 2 ml. Jeder Punkt entspricht einem Versuch.

Diese kompetitive Bindung des ^3H -ACTH durch Serumproteine und Dextrangel wurde durch die folgende Versuchsreihe bestätigt. Es wurden 100 mE ^3H -ACTH mit verschiedenen Serumengen (0.1–4.0 ml Normalserum) 3 Min. bei $+37^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Inkubationsgemische wurden auf albuminisierte Dextrangelsäulen konstanter Höhe ($h = 15\text{ cm}$) gegeben und in üblicher Weise eluiert. Die Abb. 15 zeigt die Zunahme des proteingebundenen ACTH-Anteils bei steigenden Serumengen im Inkubationsgemisch. Umgekehrt nimmt der freie, bzw. dextrangelgebundene Anteil des ^3H -ACTH mit Zunahme der Serummenge ab. Die folgende Abbildung (Abb. 16) zeigt die Abhängigkeit des proteingebundenen ACTH-Anteils von der Serummenge in % der Gesamtaktivität.

Wurde an Stelle des Normalserums mit 1 ml 5 %iger Human-Albuminlösung in 0.9 % NaCl inkubiert und dann in üblicher Weise chromatographiert, so fand sich eine Bindung des ACTH an das Albumin, die der Bindung an die Serumproteine entsprach. (Abb. 17)

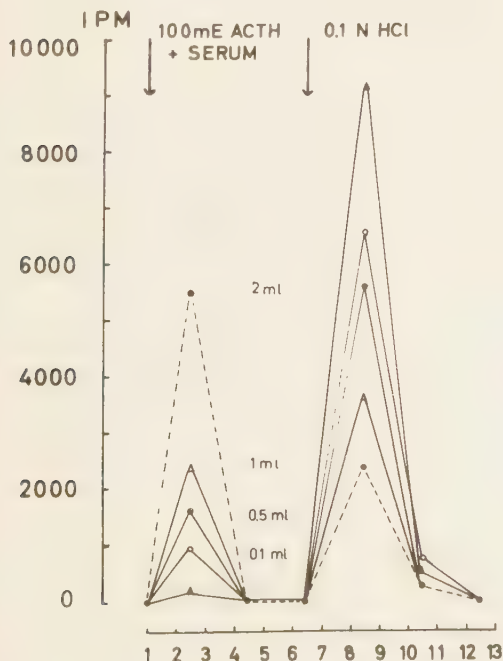


Abb. 15: Dextrangel-filtration von 100 mE ^3H -ACTH (chromatographisch gereinigt), inkubiert mit verschiedenen Serumengen. Elution mit 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.4, anschließend mit 0.1 N HCl. Säulenhöhe konstant 15 cm. Jede Kurve entspricht einem Versuch.

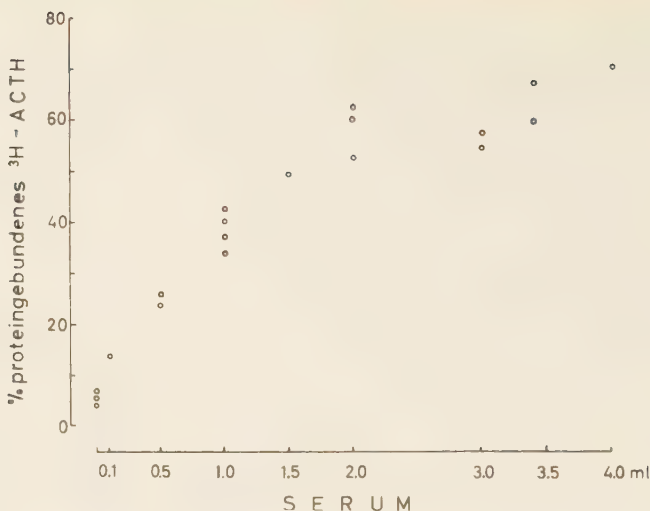


Abb. 16: Abhängigkeit des proteingebundenen ^3H -ACTH (100 mE) von der Menge des zugesetzten Serums, ermittelt durch Dextrangelfiltration. Jeder Punkt entspricht einem Versuch.

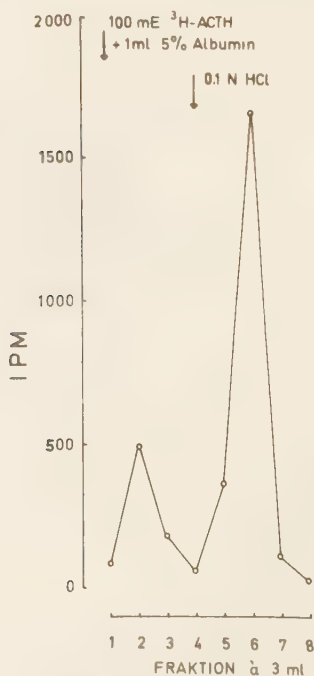


Abb. 17: Dextrangelfiltration von 100 mE gereinig. ^3H -ACTH, inkubiert mit 1 ml 5 % Albuminlösung in einem Gesamtvolumen von 2 ml.

Säulenhöhe : 16 cm. Elution mit 0.01 M Na-Phosphatpuffer, anschließend mit 0.1 N HCl.

IPM (○—○). Von den beiden Gipfeln entspricht der erste dem Albumingeb. ^3H -ACTH, der zweite dem sog. "freien", bzw. dextrangelgeb. Anteil des ^3H -ACTH.

Um das Verhalten von endogenem ACTH bei Dextrangelfiltration zu klären, wurde 2 ml Patientenplasma chromatographiert. Es handelte sich dabei um eine 29-jährige dunkelpigmentierte Patientin, die wegen eines Morbus Cushing adrenalectomiert worden war und nach Jahren einen Nelson-Tumor (R-Zellen Adenom des HVL, 62) entwickelt hatte. Sie war in unserer Klinik mit 20 mg Cortisol pro Tag (später 30 mg) substituiert. Am Tage vor der Blutentnahme war die Substitutionstherapie abgesetzt worden. Um 6.30 Uhr wurde aus der V. cubitalis 20 ml Blut abgenommen (s.METHODEN). Der ACTH-Gehalt des Plasmas lag bei drei durchgeführten Bestimmungen über 1 mE/ml. 2 ml Plasma wurden auf eine albumisierte Dextrangelsäule (h= 7 cm) gegeben und in üblicher Weise eluiert. Es wurden 6 Fraktionen à 3 ml gesammelt. Nach der 3. Fraktion wurde die Pufferelution unterbrochen und dafür mit 0.1 N HCl eluiert. In allen Fraktionen wurde die biologische ACTH-Aktivität an der hypophys-ektomierten Ratte bestimmt. Ebenfalls wurde der Proteingehalt (LOWRY, 48) und das pH in jeder Fraktion bestimmt. Wie die Abbildung (Abb. 18) zeigt, wurde in der ersten Fraktion biologisch wirksames ACTH gefunden, welches den proteingebundenen Anteil darstellt. Durch Salzsäure wurde anschließend das dextrangelgebundene, bzw. sog. "freie" ACTH eluiert (Fraktion 4 und 5).

Obwohl keine Rückschlüsse hinsichtlich der quantitativen Verteilung von proteingebundenem und sog. freien ACTH aus diesem Versuch gezogen werden können, ist doch auch hier die kompetitive Bindung von in diesem Falle endogenem ACTH durch Serum und Dextrangel deutlich.

B. Saccharosedichtegradientenzentrifugation

a) Sedimentation der Serumproteine bei der Dichtegradientenzentrifugation

Auf einen 5 - 13 % Saccharosedichtegradienten (s.METHODEN) wurden 0.2 ml Normalserum (mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 5 verdünnt) geschichtet und 4 Stunden bei 37500 UPM im SW 39 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert (s.METHODEN) und in jeder Fraktion der Serumproteingehalt bestimmt. Dabei bezeichneten wir die am Boden der Gradientensäule sich befindende Fraktion als die erste (Abb. 19a). Wie die Abbildung zeigt, fand keine wesentliche Sedimentation

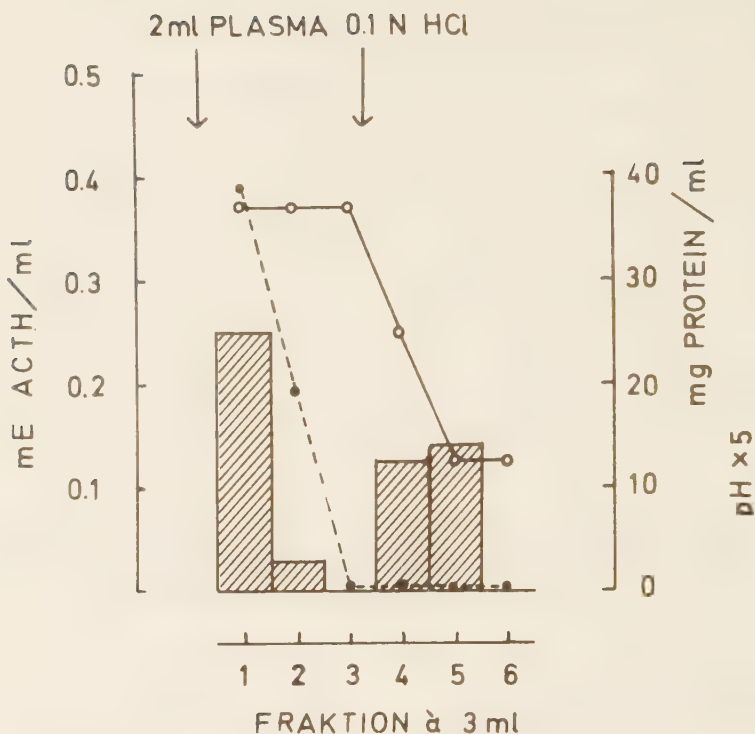


Abb. 18: Dextrangelfiltration von 2 ml Patientenplasma (M.K.) mit erhöhter endogener ACTH-Aktivität. Säulenhöhe: 7 cm, Fraktionen à 3 ml. Mit den Serumproteinen (●--●) wird ein Teil der biolog. ACTH-Aktivität (Säulen) eluiert. Der dextrangelgebundene, bzw. "freie" Anteil des ACTH wird durch 0.1 N HCl eluiert. pH (○—○).

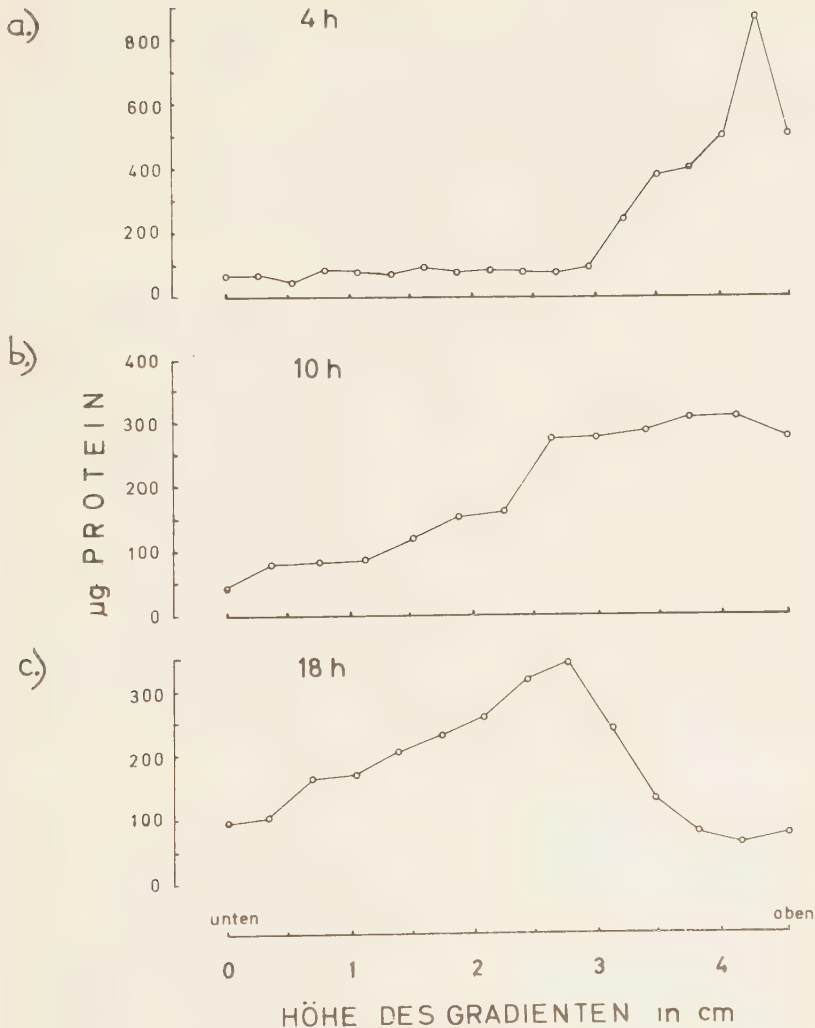


Abb. 19: Saccharosedichtgradientenzentrifugation von 0.2 ml Normalserum (mit 0.9 % NaCl 1 : 5 verdünnt). Dargestellt ist die Sedimentation der Serumproteine (Bestimmung n. LOWRY, 48) nach a) 4 Stunden b) 10 Stunden, c) 18 Stunden. Zentrifugation bei 37500 UPM. Höhe des 5 - 13 % Saccharosedichtgradienten: 4.5 cm.

statt. Die Serumproteine blieben zum größten Teil auf der Oberfläche des Gradienten. Nach zehnstündiger Zentrifugation waren die Proteine zwar schon weiter sedimentiert, doch befand sich immer noch ein beträchtlicher Teil an der Gradientenoberfläche (Abb. 19b).

Nach Zentrifugation von 18 Stunden (Abb. 19c) waren die Serumproteine von der Oberfläche bis zu 4 cm in dem Gradienten sedimentiert, wobei das Maximum der Serumproteinkonzentration bei 2 cm gefunden wurde.

Jetzt wurden 0.2 ml Normalserum mit 0.9 % NaCl 1 : 1 verdünnt auf einen Gradienten geschichtet. Nach 18-stündiger Zentrifugation wurden 5 Fraktionen gesammelt und darin jeweils der Proteingehalt bestimmt. Dann wurden die Fraktionen im Wasserbad (+ 60°C) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bis auf etwa 0.3 ml eingeengt und davon 0.012 ml zur papierelektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine verwendet (s. METHODEN). Aus dem relativen Anteil der Serumproteinfractionen wurden die absoluten Mengen der einzelnen Serumproteinkomponenten je Fraktion bestimmt. Die Abbildung (20) zeigt deutlich die verschiedenen Sedimentationsraten der Serumproteine entsprechend ihrer Molekulargewichte. Albumine und niedermolekulare α -1 Globuline wurden am wenigsten sedimentiert (2 cm). Am weitesten wanderten die großmolekularen β -Globuline (MG der β_1 -Globuline beträgt 500 000 - 1 000 000).

b) Sedimentation von β^{1-23} -Corticotropin-23-amid bei der Dichtegradientenzentrifugation

Den folgenden Versuchen lag die Frage zugrunde, wie sich ACTH allein und nach Inkubation mit Normalserum bei der Dichtegradientenzentrifugation verhält. Einmal wurden 17.2 mE β^{1-23} -Corticotropin-23-amid in 0.2 ml physiologischer Kochsalzlösung, das andere Mal wurden 17.2 mE, die mit 0.1 ml Normalserum in einem Gesamtvolumen von 0.2 ml mit 0.9 % NaCl 3 Min. bei + 37°C inkubiert worden waren, auf einen Gradienten geschichtet. Nach achtzehnstündiger Zentrifugation wurden jeweils 5 Fraktionen gesammelt, die 5 Zonen verschiedener Dichte entsprachen.



Abb. 20: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von 0.2 ml Normalserum (mit 0.9 % NaCl 1 : 1 verdünnt). Dargestellt ist die Sedimentation der einzelnen Serumproteinfraktionen (Bestimmung nach LOWRY, 48 nach 18 Stunden Zentrifugation bei 37500 UPM. Höhe des 5 - 13 % Saccharosegradienten: 4.5 cm.

In allen Fraktionen wurde die biologische ACTH-Aktivität bestimmt (Versuche mit F. KLUGE, 21). Bei dem Gradienten, der nur mit NaCl gelöstem β^{1-23} -Corticotropin-23-amid überschichtet war, zeigten die ersten drei Fraktionen keine biologische Aktivität. Die vierte Fraktion zeigte einen gerade meßbaren Corticosteronanstieg im Nebennierenvenenblut und in der fünften Fraktion war die Corticosteroninkretion maximal stimuliert. (Abb. 21).

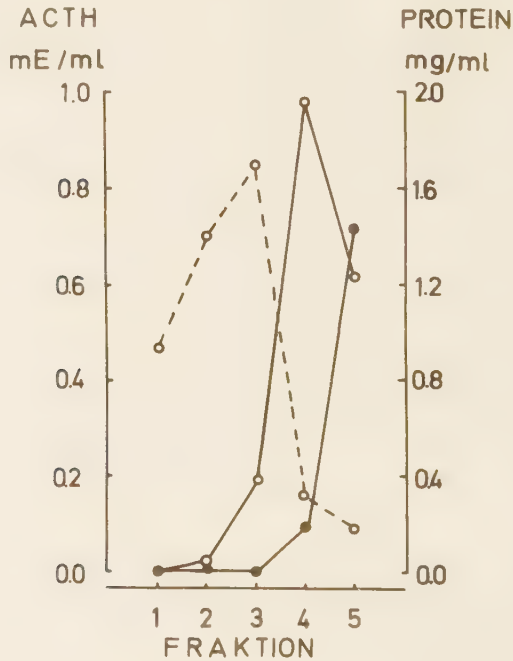


Abb. 21: Saccharosedichtgradientenzentrifugation von ACTH. 17.2 mE des β^{1-23} Corticotropin-23-amid wurden einmal in physiolog. Kochsalzlösung (●—●), zum anderen mit Normalserum inkubiert (○—○), 18 Stunden bei + 4°C und 37500 UPM zentrifugiert. Neben der ACTH-Aktivität wurde in allen 5 Fraktionen der Proteingehalt nach LOWRY (48) bestimmt (○--○).

Das β^{1-23} -Corticotropin-23-amid sedimentierte also praktisch nicht, sondern blieb an der Gradientenoberfläche.

Wurde das ACTH vor Zentrifugation mit Normalserum inkubiert, so fand sich in den ersten beiden Fraktionen ein Corticosteronanstieg, der noch als im Basisbereich liegend gelten kann. Die dritte, stärker noch die vierte und fünfte Fraktion zeigten hingegen eine deutliche Stimulierung der Rattennebenniere (Abb. 21).

Die weitere Sedimentation des mit Serum inkubierten ACTH ist durch dessen Bindung an Serumproteine erklärbar. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß die in jeder Fraktion vorgenommene Proteinbestimmung (LOWRY, 48) zeigte, daß gerade in der dritten Fraktion die höchste Proteinkonzentration gefunden wurde (zum größten Teil Albumine s.o.).

c) Sedimentation von Tritium markiertem β^{1-23} -Corticotropin-23-amid-acetat

Die gleiche Technik der Dichtegradientenzentrifugation wurde auch zur Bestimmung der Sedimentation von mit Tritium markiertem ACTH angewandt. Dabei wurden 0.4 ml eines Inkubationsgemisches (200 mE gereinigtes β^{1-23} -Corticotropin-23-amid-acetat; 0.2 ml 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 7.5; 0.4 ml Normalserum, resp. 0.9 % NaCl in einem Gesamtvolumen von 0.8 ml) auf einen 5 - 13 % Saccharosedichtegradienten geschichtet. Nach achtzehnstündiger Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen punktiert (s. METHODEN) und die gesammelten Fraktionen zur Flüssigkeitsscintillationszählung aufbereitet. Wiederum zeigte sich, daß das ACTH, das vor der Zentrifugation mit Serum inkubiert worden war, weiter sedimentierte. Nicht mit Serum inkubiertes ACTH blieb an der Gradientenoberfläche und wurde fast nicht sedimentiert (Abb. 22).

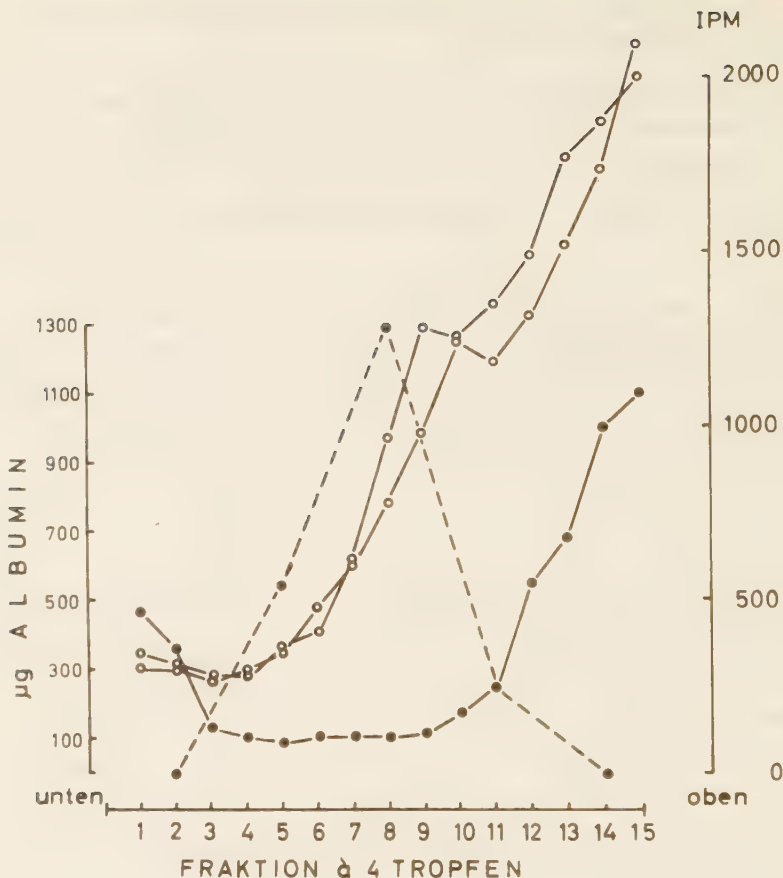


Abb. 22: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von 0.4 ml eines Inkubationsgemisches: (200 mE gereinigtes ^3H -ACTH, 0.2 ml 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 7.5, 0.4 ml Normalserum (○—○), resp. 0.9 % NaCl (●—●) in einem Gesamtvolumen von 0.8 ml). Höhe des Gradienten: 4.5 cm. 18 Stunden Zentrifugation bei + 4°C und bei 37500 UPM. Zum Vergleich ist die Sedimentations der Albumine (●—●) dargestellt (Protein nach LOWRY, 48).

Bei diesen Versuchen mußten wir feststellen, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil des ^3H -ACTH an der Wand des Zentrifugenröhrchens hängen blieb.

Die Wiederfindequote betrug nur 55 % ($n=7$). Ohne Seruminkubation wurden sogar nur 33 % ($n=5$) wiedergefunden. Die höhere Wiederfindequote nach Seruminkubation macht ein kompetitives Verhalten von Serumproteinen und Zellenitratmolekülen der Wand des Zentrifugenröhrchens bezüglich der Bindung von ^3H -ACTH wahrscheinlich. Ein großer Teil der fehlenden Radioaktivität konnte in den leeren Zentrifugenröhrchen nachgewiesen werden (ungünstige Zähltechnik; der Quencheffekt war wegen des freien Umherschwimmens des Zentrifugenröhrchens in der Szintillationsflüssigkeit des Zählgläschens nicht zu korrigieren). Ein vorheriges Absättigen der Zentrifugenröhrchen mit Albumin oder nichtmarkiertem Corticotropin hatte keine Verbesserung der Wiederfindequote zur Folge, ebenso nicht die Verwendung von Polypropylenzentrifugenröhrchen (MSE).

Wurde an Stelle des Normalserums eine 5 % Humanalbuminlösung zur Inkubation mit 100 mE ^3H -ACTH verwendet (Abb. 23a und b), so fanden wir bei Inkubation mit Albumin ebenfalls eine weitere Sedimentation und höhere Wfq (71 %) als bei Inkubation in 0.9 % NaCl. Um das unterschiedliche Verhalten von albumingebundenem und freiem ACTH deutlich zu demonstrieren, wurde von dem nicht mit Albumin inkubierten ^3H -ACTH in einem Versuch auch die doppelte Menge (200 mE) auf den Gradienten gegeben (Wfq= 33 %)

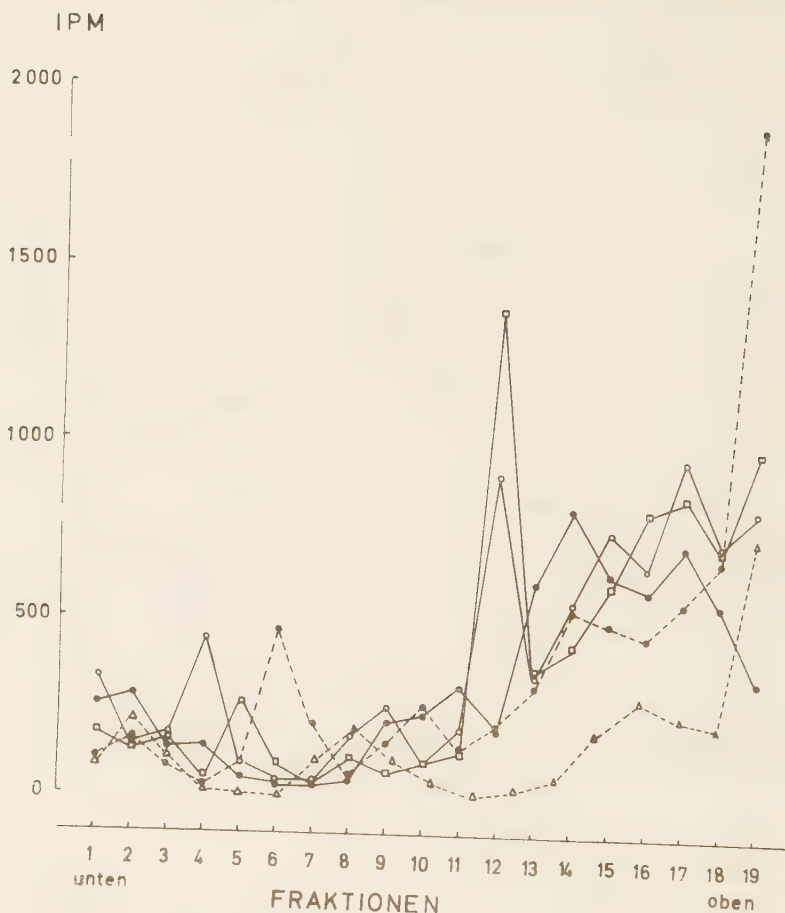


Abb. 23 a: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von ^3H -ACTH. Dabei wurden 100 mE des ^3H - β^1 -23Peptids mit 0.2 ml 5 % Albuminlösung inkubiert; drei Versuche (□—□). 100 mE ^3H -ACTH mit 0.2 ml 0.9 % NaCl (Δ--Δ) 200 mE ^3H -ACTH mit 0.9 % NaCl (●—●). Aufgetragenes Gesamtvolumen betrug jeweils 0.4 ml. Gradientenhöhe: 4.5 cm. Zentrifugationszeit: 18 Stunden bei 37500 UPM bei 4°C.

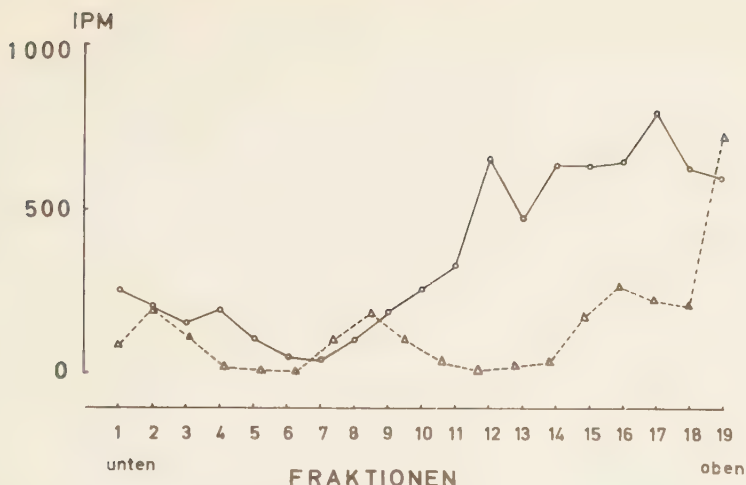


Abb. 23 b: Saccharosedichtgradientenzentrifugation von ^3H -ACTH.
 ^3H -ACTH mit 5 % Albuminlös. (o—o), Mittelwerte der 3 Versuche
 von Abb. 23a; ^3H -ACTH mit 0.9 % NaCl (Δ--Δ).

Dieselbe Technik der Dichtgradientenzentrifugation wurde in Versuchen mit M. MÜLLER-BARDORFF auch zur Ermittlung der Proteinbindung von ^{14}C -Cortisol angewandt (63). Dabei zeigte sich, daß nach Inkubation mit Normalserum eine weitere Sedimentation durch Proteinbindung des ^{14}C -Cortisol stattfand (Abb. 24). Eine Inkubation des ^{14}C -Cortisol mit Albumin hatte, im Gegensatz zu unseren Experimenten mit ^3H -ACTH, keinen Effekt auf die Sedimentation, was auf eine spezifische Bindung des Cortisols durch α -Globuline hinweist (CBG = Cortisol Binding Globulin), die ebenfalls in dieser Zone gefunden werden, während ACTH in diesen hohen Konzentrationen offenbar durch Albumin gebunden wird.

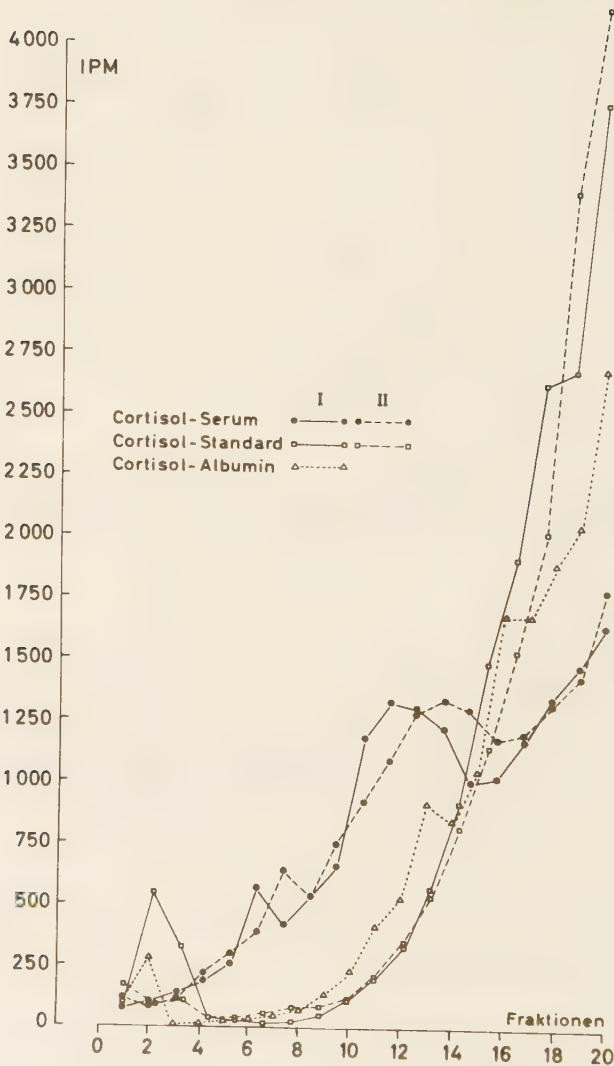


Abb. 24: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von ^{14}C -Cortisol.
Cortisol mit 0.2 ml Serum (●—●, ●—●), Wfq: 101 %. Cortisol mit 0.2 ml 5 % Albuminlösung (△—△—△), Wfq: 86 %. Cortisol mit 0.9 % NaCl (□—□, □—□), Wfq: 101 %. Es wurde jeweils 15 Min. bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 0.4 ml inkubiert und 18 Stunden 37500 UPM und +4°C zentrifugiert.

3.) ACTH-Bestimmungen im Plasma und Tumor bei ektopischem ACTH-Syndrom

Es ist bekannt, daß gewisse Tumoren gelegentlich ein adrenocorticotropes Hormon produzieren können, das sich biologisch, chemisch und immunologisch nicht von nativem, aus Hypophysen gewonnenem ACTH unterscheiden läßt (60, 64). Dabei können so verschiedene Gewebe wie Lunge, Mediastinum, Oesophagus, Leber, Pancreas, ja sogar Nervengewebe, den Tumoren als Stammgewebe dienen (65,66). Durch seine Wirkung auf die Nebennierenrinde kann das nichthyophysäre, "ektopische ACTH" alle chemischen und klinischen Veränderungen eines Hypercorticismus bewirken. Im Gegensatz zum hypophysären ACTH ist die ektopische ACTH-Produktion nicht durch Dexamethason unterdrückbar (60). Es besteht also kein Rückkopplungsmechanismus, so daß man bei einem durch ein "ektopisches ACTH" bedingten Hypercorticismus meistens eine erhöhte Plasma-ACTH-Aktivität findet.

Bei Patienten mit z.B. M.Addison oder nach totaler Adrenalectomie wegen Cushing-Syndroms und einem chromophoben Adenom des Hypophysenvorderlappens (Nelson-Tumor, 62) findet man ebenfalls meßbare erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel, wobei die ACTH-Aktivität des Plasmas aus dem Bulbus cranialis venae jugularis höher ist als in der Peripherie (19-21). Hier war zu klären, ob in Fällen, bei denen der Ort der Produktion erhöhter ACTH-Aktivität in der Peripherie und nicht im Hypophysenvorderlappen liegt, keine Differenzen der ACTH-Aktivitäten zwischen Bulbus cran. ven. jug. und der Peripherie gefunden werden.

A. Kasuistische Beiträge

a.) Die 55 Jahre alte Frau M. B. wurde wegen eines insulinbedürftigen Diabetes mellitus mit ausgeprägter Hypokaliämie und erhöhten 17-Keto- und 17-Hydroxysteroidausscheidungen unter dem Verdacht auf ein Cushing-Syndrom in unsere Klinik eingeliefert.

Aus ihrer Vorgeschichte ging hervor, daß sie seit einem halben Jahr vermehrten Durst mit gesteigerter Diurese und Nykturie verspürte. Dazu kamen Appetitlosigkeit, zunehmende Müdigkeit und muskuläre Schwäche, Obstipation und Zunahme

des Bauchumfanges sowie Paraesthesien an Händen, Füßen und Gesicht und diffuse Schweißausbrüche. Bei der körperlichen Untersuchung der trotz Anaemie dunkel pigmentierten Patientin war die Leber 2 Querfinger unter dem Rippenbogen zu tasten; die Milz war nicht palpabel. Es bestand eine leichte Stammfett-sucht, ein etwa handbreiter Ascites beidseits und Unterschenkeloedeme.

Der Blutdruck war 145/90 (im Einweisungsbefund 170/100). Die augenärztliche Untersuchung ergab einen ausgeprägten Fundus hypertonicus. Bei der Aufnahme (13.3.67) bestand eine Hypokalaemie von 2.25 mval/l ($\text{Na}=143$ mval/l, Blut-pH= 7.69, $\text{Ca}=4.05$ mval/l, Bicarbonat= 36 mval/l mit einem Standardbicarbonat= 41.5 mval (normal 22) bei normalem CO_2 -Partialdruck (39 mm Hg) als Ausdruck der metabolischen Alkalose (Abb. 25). Der Blutzucker war um 200 mg%.

Am 14.3. wurden die sogenannten 11-OHCS im Serum bestimmt: 9 Uhr = 136 Gamma %, 18 Uhr = 128 Gamma %. Diese unglaublich hohen Werte kamen durch die Aldactonetherapie zustande, welche den "Plasmacortisolwert" bei unserer Messung verfälscht. Daher wurde die prozentuale Bindung von ^{14}C -Cortisol im Serum bestimmt (67). Dabei ergab sich für 9 Uhr 28.45 % gebundenes (normal: $\bar{x} \pm s = 90.6 \pm 2.1$ %) und 71.55 % sog. freies Cortisol (63,67). Es bestand also ein Mischbild eines Hypercorticismus und eines schweren Mineralocorticoidsyndroms (68). Zusätzliche Bestimmungen der Urinausscheidungen an 17-Ketosteroiden und 17-Hydroxysteroiden ergaben 28.4 mg/Tag bzw. 23.9 mg/Tag. Die weitere Diagnostik ergab eine BKS von 70/108 und in der Elektrophorese eine Alpha-1 und Alpha-2-Vermehrung. Bei unauffälligem roten Blutbild ergab das weiße Blutbild folgende Verhältnisse: 8000 Leuko, 24 % Stab, 61 % Segment, 8 % Lympho, 6 % Mono und eine Plasmazelle. Dazu eine absolute Eosinopenie. Da das Pneumoretroperitoneum keine Anhaltspunkte für ein NNR-Adenom ergab (Sella röntgenologisch unauffällig) wurde an ein paraneoplastisches Cushing-Syndrom (ektopisches ACTH-Syndrom) gedacht. Ein Leberszintigramm machte Lebermetastasen wahrscheinlich. Die Laparoskopie zeigte eine Leber, die von Metastasen völlig durchsetzt war.

Da die Patientin kaum noch Nahrung zu sich nahm (Gewichtsabnahme s. Abb. 25), kam es zusehends zum körperlichen Verfall. Angesichts der infausten Diagnose

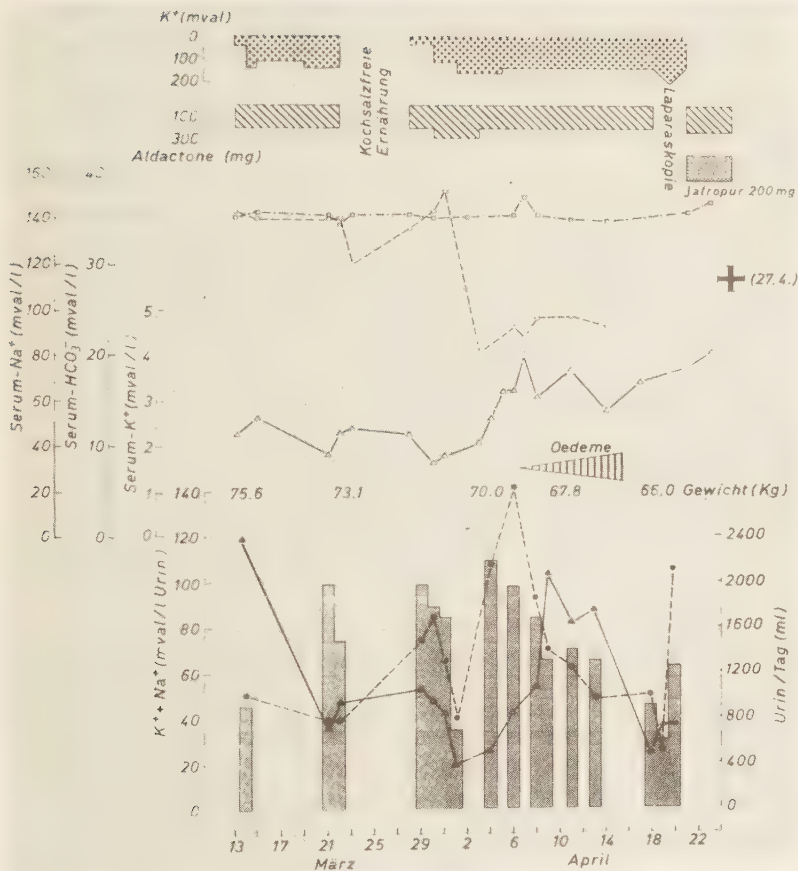


Abb. 25: Ektopisches ACTH-Syndrom (Patientin M.B., 55 Jahre alt)
 Kaliuminfusions- und Aldactone[®]-Therapie (oberes Drittel der Abb.),
 Serum- Na^+ (□---□), Serum- K^+ (Δ---Δ), Serum- HCO_3^- (○---○).
 Urinausscheidung pro Tag (Säulen), Na^+ im Urin (●---●),
 K^+ im Urin (▲---▲).

wurde auf jede weitere gezielte Therapie verzichtet. Die Patientin verstarb unter Temperaturanstieg am 27.4.1967 (Abb. 25). Die Autopsie ergab ein hühnereigrößes Pankreasschwanzkarzinom (histologisch ein entdifferenziertes Adenocarcinom) mit ausgedehnter Metastasierung in der Leber. Dazu fand sich eine Hypertrophie der Nebennierenrinde (Nebennierengewicht zusammen 40 g) mit Zeichen der Entspeicherung. Ebenso eine mäßige Osteoporose und eine basale Subarachnoidalblutung.

Wegen des Verdachtes auf ein ektopisches ACTH-Syndrom wurde bei der Patientin am 24.4.67 eine Bestimmung der ACTH-Aktivität im Plasma durchgeführt. Dabei wurde sowohl die ACTH-Aktivität im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis wie aus der V. femoralis bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2: ACTH-Aktivität (mE/ml Plasma) im Bulbus c.v.j. und V. femoralis

Zeit nach Punktion des Bulbus c.v.j.	10 Min.	20 Min.
Bulbus c.v.j.	0.066 mE/ml ($\bar{x}$, n = 2)	0.048 $\pm$ 0.024 mE/ml ($\bar{x} \pm s$, n = 4)
V. fem.	0.059 $\pm$ 0.030 mE/ml ($\bar{x} \pm s$, n = 3)	0.045 $\pm$ 0.044 mE/ml ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Die Differenz jeweils der Mittelwerte aller sechs Bestimmungen vom Bulbus c.v.j. ($\bar{x}$ = 0.057 mE ACTH/ml Plasma) und von der V.femoralis ($\bar{x}$ = 0.052 mE ACTH/ml Plasma) war nicht signifikant (p = $>$ 0.45).

Noch während der Autopsie (Pathologisches Institut der Universität München, Dir. Prof. Dr. W. Büngeler) wurde aus dem Primärtumor im Pankreasschwanz und aus den Lebermetastasen Gewebestücke entnommen und bis zur Extraktion eingefroren (-18°C). 1 g des Primärtumors wurde in der angegebenen Weise (s.METHODEN) aufgearbeitet. Das in 3 ml 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.4 gelöste Diäthylätherpräecipitat wurde auf eine 6 cm hohe albuminisierte Dextrangelsäule gegeben und wie üblich eluiert. Puffereluat und 0.1 N HCl Eluat betrugen

jeweils 5 ml. In beiden Fraktionen wurde die ACTH-Aktivität bestimmt.

Puffereluat (5 ml) = 0.000 mE/ml (n = 3)

0.1 N HCl-Eluat (5 ml) = 0.105 mE/ml (n = 2)

Der "ACTH"-Gehalt des Primärtumors ergab also etwa 0.53 mE/g Tumor.

2 g einer Lebermetastase wurde ebenso aufgearbeitet. Dabei war das Diaethyl-aetherpraecipitat noch reich an Eiweißstoffen im Gegensatz zum Praecipitat des Primärtumors.

Die ACTH-Bestimmung ergab:

Puffereluat (5 ml) = 0.184 mE/ml (n = 3)

0.1 N HCl-Eluat = 0.000 mE/ml (n = 2)

Der "ACTH"-Gehalt der Lebermetastase betrug also 0.46 mE/g Tumor.

Daß diesmal die ACTH-Aktivität im Puffereluat gefunden wurde, kann vielleicht durch die Bindung des "ACTH" an verunreinigende Proteine erklärt werden. Auf die gleiche Weise extrahierte Lebermetastasen eines Colonicarcinoms eines Patienten ohne endokrine Störungen zeigten bei der biologischen Testung keine ACTH-Aktivität.

b.) Die Patientin M.R., 54 Jahre alt, die wir gemeinsam mit Doz. Dr. Karl und Dr. Raith[†] (I. Med. Klinik der Universität München) untersuchten, war 1966 wegen eines Morbus Cushing mit Stammfettsucht, Mondgesicht, Diabetes mellitus und einem ausgeprägten endokrinen Psychosyndrom beidseits adrenalectomiert worden. Außerdem bestand vor der Adrenalectomie eine Hypokalaemie von 2.75 mval/l mit hypokalaemischer Alkalose ($\text{HCO}_3 = 32$ mval/l) und eine dunkle Pigmentation. Die Steroidausscheidung im Urin betrug 40.8 mg für die 17-Ketosteroide und 20.0 mg für die 17-Hydroxysteroide pro 24 Stunden. Nach der Adrenalectomie verschwanden der Diabetes mellitus, ebenso die Störung des Elektrolythaushalts und die psychischen Veränderungen. Allein die dunkle Pigmentation blieb weiter bestehen. Die Patientin wurde mit 35 bis 40 mg Hydrocortison und einer Tablette Florinef^R pro Tag eingestellt.

†) Wir danken Herrn Doz. Dr. Karl und Herrn Dr. Raith für die Überlassung der Anamnese und der Befunde.

Anfang des Jahres 1967 wurden bei der Patientin Lebermetastasen festgestellt, wobei ein Primärtumor nicht ermittelt werden konnte. Wegen des jetzt aufkommenden Verdachtes auf ein paraneoplastisches Cushingssyndrom wurde von uns der Patientin, nachdem die Substitutionsbehandlung für einen Tag abgesetzt worden war, je 20 ml Blut aus dem Bulbus c.v.j. und der V. cubitalis entnommen (19.7.67). Leider gelang uns aus technischen Schwierigkeiten jeweils nur eine ACTH-Bestimmung (bei hochsommerlichen Temperaturen stirbt eine große Anzahl der Ratten während der Operation, 40). Dazu werden häufig ungewöhnlich hohe Werte für die Basiscorticosteroninkretion (57) gefunden. Im Plasma aus dem Bulbus c.v.j. ergab eine Bestimmung eine ACTH-Aktivität von 0.325 mE/ml Plasma. Im Plasma aus der V. cubitalis wurden bei einer Bestimmung 0.310 mE ACTH/ml Plasma gefunden. Leider kann an Hand von zwei Werten bei unserer Methode mit ihrer großen Streuung keine Aussage hinsichtlich einer fehlenden Differenz zwischen zentraler (B.c.v.j.) und peripherer (V.cubit.) ACTH-Plasma-Konzentration gemacht werden (19-21). Die Patientin starb am 29.9.67 an Kreislaufversagen. Bei der Obduktion (Pathologisches Institut der Universität München, Dir. Prof. Dr. W. Büngeler) wurde ein Pankreascarcinom als Primärtumor entdeckt, der von uns zur Ermittlung des ACTH-Gehaltes aufgearbeitet wurde (s.METHODEN). Die anschließend vorgenommene ACTH-Bestimmung ergab bei drei Bestimmungen einen mittleren ACTH-Gehalt von 1.68 mE/g Tumorgewebe, so daß die Diagnose eines paraneoplastischen Cushingssyndroms doch noch gesichert werden konnte.

B. Besprechung der Ergebnisse

Die klinisch-pathologische Syntropie von malignen Tumoren und ektoptischer Hormonbildung kann nicht mehr als Seltenheit bezeichnet werden (65,66). Besonders die ektoptische ACTH-Bildung ist ausführlich beschrieben und untersucht worden (60,62,64-66,69-71). Aber nicht nur ACTH, sondern auch andere Hormone wie Insulin (72), Choriongonadotropin (73), T S H (74), Parathormon (75), Östrogene (76), Antidiuretisches Hormon (77), Serotonin (78), Gastrin (79) und auch mehrere Hormone zugleich (80) können in malignen Tumoren gebildet werden.

Bei unseren zwei Fällen handelte es sich jeweils um eine ektopische ACTH-Bildung in Pankreascarcinomen. Dies ist insofern bemerkenswert, da die ektopische ACTH-Bildung im Pankreas im Vergleich zu Bronchialcarcinomen relativ selten ist (65,66). KRACHT (66) fand in der Literatur 15 Fälle von Cushing-syndrom bei Pankreascarcinomen. Die Eisessigextraktion des "ACTH" aus dem feuchten Tumorgewebe mit nachfolgender Diaethylaetherfällung des Peptids (60) kann nur zur groben Orientierung über die ACTH-Konzentration im Tumorgewebe dienen. In unseren beiden Fällen fand sich im Primärtumor bei der biologischen Bestimmung ACTH-Aktivität, wobei im ersten Fall (Pat. M.B.) auch die Lebermetastasen auf ACTH untersucht wurden. Sie zeigten ebenfalls deutlich ACTH-Aktivität bei der Bestimmung an der hypophysektomierten Ratte. Dabei stimmten die gefundenen ACTH-Konzentrationen im Tumor mit denen anderer Autoren überein (60,65,66).

Klinisch stand in beiden unserer Fälle die Elektrolytstörung mit ausgeprägter hypokaliämischer Alkalose im Vordergrund (Minerabäortcoidsyndrom). Ein typischer Cushing-Aspekt war nur in dem zweiten Fall (Pat. M.R.) vorhanden, ebenso die auffällig dunkle Pigmentation und das endokrine Psychosyndrom. Urinausscheidung von 17-Ketosteroiden und 17-Hydroxysteroiden war bei beiden Patientinnen erhöht (Hypercorticismus), ebenso fand sich beidesmal ein Diabetes mellitus. Bei der Bestimmung der ACTH-Aktivität im Plasma der ersten Patientin (M.B.) fanden wir mäßig erhöhte Werte. Die Differenz von jeweils sechs ACTH-Bestimmungen im Plasma vom Bulbus c.v.j., in den das im HVL gebildete ACTH über den Sinus cavernosus und die Sinus petrosi gelangt (81), und der V. femoralis war nicht signifikant (82). Im zweiten Fall wurden höhere ACTH-Plasmaspiegel gefunden. Über eine fehlende zentrale - periphere Differenz ließ sich hier auf Grund von nur zwei Bestimmungen nichts aussagen.

Die fehlende zentrale - periphere Differenz der ACTH-Plasmaswerte (erster Fall) spricht für eine ektopische Bildung des ACTH, die von den meisten Autoren angenommen wird, und gegen eine bloße Speicherung von HVL-produziertem ACTH im Tumor, wogegen auch die in fast allen Fällen beschriebenen niedrigen ACTH-Konzentrationen im HVL sprechen würden (60). Inwieweit die ACTH-Bestimmung im Plasma vom Bulbus c.v.j. und der Peripherie zur Differentialdiagnose einer ektopischen, bzw. hypophysären ACTH-Bildung benutzt werden kann, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Zweifellos werden diese zeitraubenden

biologischen ACTH-Bestimmungen niemals routinemäßig durchgeführt werden können und immer einem Speziallabor vorbehalten bleiben. Für den Fall jedoch, daß eine zuverlässige, empfindliche und genaue radioimmunologische Methode zur ACTH-Bestimmung in Zukunft zur Verfügung stehen sollte, könnte die gleichzeitige Bestimmung von zentralen (B.c.v.j.) und peripheren ACTH-Plasmaspiegeln eventuell als diagnostische Maßnahme zur Entdeckung eines malignen Tumors mit ektopischer ACTH-Bildung an Bedeutung gewinnen.

4.) Vorversuche zur immunologischen ACTH-Bestimmung

Ziel unserer Untersuchungen war die Erzeugung von neutralisierenden Antikörpern gegen ACTH in Meerschweinchen. Dabei ist eine möglichst große Spezifität der Antikörper gegen biologisch aktives ACTH wünschenswert. Da die letzten 16 Aminosäuren des 1-39-Peptids für die biologische Aktivität des Hormons nicht verantwortlich sind, jedoch ein Antigen darstellen und somit in der Lage sind, Antikörper zu binden (31), wäre ein Antikörper gegen ein ACTH-Peptid, das aus den ersten 23 Aminosäuren besteht, am günstigsten.

Zur Entdeckung der Antikörper benutzten wir dessen neutralisierende Wirkung auf den durch ACTH stimulierten Corticosteronanstieg im Nebennierenvenenblut der hypophysektomierten Ratte (29,31): 0.86 mE β^{1-23} Corticotropin-23-amid in 1.0 ml physiolog. Kochsalzlösung wurden mit 1.0 ml eines mit 0.9 % NaCl 5 : 1 verdünnten Serums von einem nicht mit ACTH immunisierten Meerschweinchen, resp. mit physiologischer Kochsalzlösung 30 Min. bei $+3^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Davon wurden 1.0 ml (also 0.43 mE ACTH in 1 : 10 verdünntem Meerschweinchenserum) der hypophysektomierten Ratte in üblicher Weise intraaortal appliziert und der Corticosteronanstieg im Nebennierenvenenblut gemessen (s. METHODEN). Dabei zeigte sich, daß nach Inkubation mit dem Serum eines nicht immunisierten Tieres die biologische ACTH-Aktivität des β^{1-23} Peptids bis auf etwa den zwölften Teil der ursprünglichen Aktivität abnimmt (Abb. 26). Diese unspezifische Inaktivierung der biologischen Wirksamkeit des synthetischen β^{1-23} Peptids wäre von einer spezifischen, Antikörper bedingten Aktivitätsminderung nicht zu unterscheiden und macht damit den Neutralisationstest für den Nachweis von Antikörpern gegen das β^{1-23} ACTH ungeeignet.

Deshalb wurde für unsere Neutralisationsteste ein natives, stark gereinigtes Schweine-ACTH (Cortrophine^R, s. Abb. 1c) verwendet. Allerdings stimmte die von der Firma angegebene Aktivität (50 IE = 0.4 mg hochgereinigtes Peptid in insgesamt 25.4 mg Trockensubstanz) bei unseren biologischen Bestimmungen nicht mit der Aktivität des synthetischen β^{1-23} Corticotropin-23-amid überein. (Zur Problematik der Aktivitätsangabe in Einheiten bei biologischen ACTH-Bestimmungen siehe PRAEPARATE und METHODEN, 1. ACTH-Lösungen und DISKUSSION).

2.5 mE des Schweine-ACTH ergaben einen Corticosteronanstieg von $\bar{x} \pm s = 1.619 \pm 0.616 \mu\text{g}$ Corticosteron, der sich nicht signifikant von dem durch 0.43 mE des β^{1-23} Corticotropin-23-amid bedingten Anstieg des Corticosterons im Nebennierenvenenblut der hypophysectomierten Ratte unterschied ($\bar{x} \pm s = 1.889 \pm 0.959 \mu\text{g}$ Corticosteron, Abb. 26). Beide Dosen ergaben eine submaximale Stimulierung der Corticosteroninkretion. Im folgenden Versuch wurden 5.0 mE Schweine-ACTH in 1.0 ml 0.9 % NaCl mit 1.0 ml 1 : 5 verdünntem Meerschweinchen- oder Meerschweinchenserum nicht immunisierter Tiere 30 Min. bei $+3^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Davon wurde wiederum 1.0 ml (also 2.5 mE in 1 : 10 verdünntem Meerschweinchenserum) der Ratte wie üblich infundiert. Es zeigte sich, daß im Gegensatz zum ACTH-Peptid bestehend aus den ersten 23 Aminosäuren des nativen Corticotropins das 39-Peptid durch das Serum nicht inaktiviert wurde (Abb. 26). Inkubation von 2.5 mE Schweine-ACTH nur mit 0.9 % NaCl oder mit Meerschweinchenserum hatte also keinen Einfluß auf den Corticosteronanstieg.

Nun wurden acht Meerschweinchenserum von Tieren, die im 8-Tageintervall zehnmal mit je 6 IE Schweine-ACTH immunisiert worden waren (s.METHODEN), auf die gleiche Weise durchgetestet. Es zeigte sich, daß das Serum von keinem der Tiere in der Lage war, die ACTH-Aktivität zu neutralisieren. Der Mittelwert des Corticosteronanstiegs $\bar{x} \pm s = 1.502 \pm 1.000 \mu\text{g}$ Corticosteron bei 17 Versuchen (2 Bestimmungen je Tier) entsprach dem Corticosteronanstieg, der durch 2.5 mE Schweine-ACTH hervorgerufen wurde, das mit Serum von nicht vorbehandelten Tieren, resp. mit physiolog. Kochsalzlösung inkubiert worden war.

Darauf wurde ein Kollektiv von 15 Meerschweinchen mit 25 IE Schweine-ACTH immunisiert (s.METHODEN). Es wurden jeweils neun Injektionen verabreicht, wobei der Abstand zwischen den einzelnen Injektionen neun bis zehn Tage betrug. Zehn Tage vor der Blutentnahme (s.METHODEN) wurde noch eine Boosterinjektion mit ebenfalls 25 IE Schweine-ACTH verabreicht. Die Seren wurden im Verhältnis 1 : 5 mit 0.9 % NaCl verdünnt und jeweils 1.0 ml mit 5 IE Schweine-ACTH in 1.0 ml physiologischer Kochsalzlösung 30 Min. bei $+3^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Davon wurden unmittelbar nach der Inkubation 1.0 ml (also 2.5 mE Schweine-ACTH in 1 : 10 verdünntem Meerschweinchenserum) der hypophysectomierten Ratte

μg Corticosteronanstieg
pro 8 Min

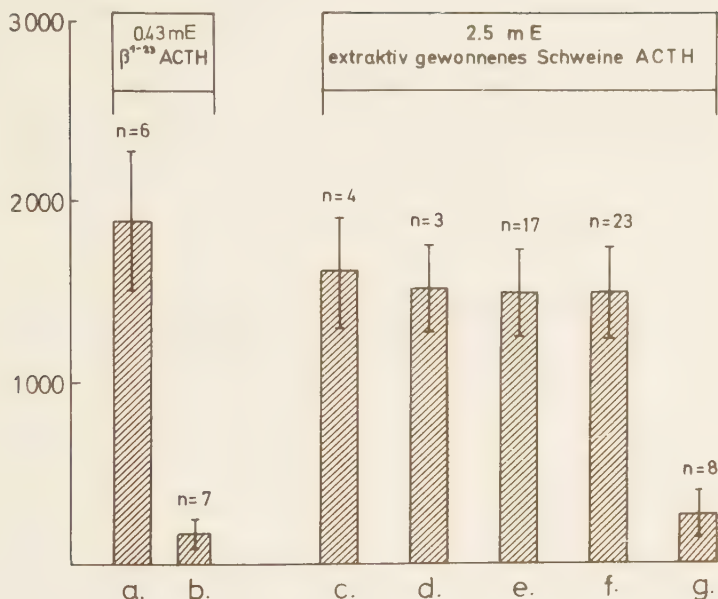


Abb. 26: Corticosteronanstieg ($\bar{x} \pm s$) im Nebennierenvenenblut der hypophysectomierten Ratte nach intraaortaler Applikation von:

- 0.43 mE β^{1-23} Corticotropin-23-amid in 0.9 % NaCl
- 0.43 mE β^{1-23} Corticotropin-23-amid in 1 : 10 verdünntem Serum von nicht mit ACTH vorbehandelten Tieren
- 2.5 mE Schweine-ACTH in 0.9 % NaCl
- 2.5 mE Schweine-ACTH in 1 : 10 verdünntem Serum von nicht mit ACTH vorbehandelten Tieren
- 2.5 mE Schweine-ACTH in 1 : 10 verdünntem Serum, von 8 mit 6 IE Schweine-ACTH immunisierten Tieren (10 Injekt.)
- 2.5 mE Schweine-ACTH in 1 : 10 verdünntem Serum von 12 mit 25 IE Schweine-ACTH immunisierten Tieren; keine Antikörperbildung (10 Injekt.)
- 2.5 mE Schweine-ACTH in 1 : 10 verdünntem Meerschweinchenserum von 3 mit 25 IE Schweine-ACTH immunisierten Tieren; neutralisierende Antikörper nach 10 Injektionen.

infundiert. Es zeigte sich, daß von den 15 Seren zwölf nicht in der Lage waren, den durch 2.5 mE Schweine-ACTH bedingten Corticosteronanstieg zu neutralisieren oder zu vermindern (Abb. 26). Der Corticosteronanstieg lag bei 23 Bestimmungen bei $\bar{x} \pm s = 1.506 \pm 1.208 \mu\text{g}$ Corticosteron und unterschied sich somit nicht von dem, der durch 2.5 mE Schweine-ACTH hervorgerufen wird, das mit Serum von nicht mit ACTH vorbehandelten Tieren, bzw. physiologischer Kochsalzlösung inkubiert wurde (Abb. 26). Bei drei Seren hingegen fanden wir eine deutliche Verminderung des Corticosteronanstiegs, die uns vermuten ließ, daß diese Tiere neutralisierende Antikörper gegen ACTH gebildet hatten (Tab. 3).

Tab. 3: Corticosteronanstieg pro 8 Min. nach Gabe von 2.5 mE Schweine-ACTH in 1.0 ml 1 : 10 verdünntem Meerschweinchen-anti-ACTH-serum.

1. Tier	0.046 μg Corticosteron (n = 2)
2. Tier	0.279 μg Corticosteron (n = 3)
3. Tier	0.427 μg Corticosteron (n = 3)

Der Mittelwert des Corticosteronanstiegs dieser 8 Bestimmungen lag bei $\bar{x} \pm s_{\bar{x}} = 0.270 \pm 0.136 \mu\text{g}$ Corticosteron. Der Unterschied des Corticosteronanstiegs zwischen diesen drei und den übrigen 12 Tieren war signifikant ($p = < 0.025$).

Die Ausbeute von Antikörper bildenden Tieren betrug bei einem Kollektiv von 15 Meerschweinchen, die jeweils zehnmal mit 25 IE Schweine-ACTH immunisiert worden waren, somit 20 %.

DISKUSSION

Auf die Bedeutung einer genauen, empfindlichen und spezifischen Methode zur Bestimmung von ACTH-Plasmaspiegeln wurde in dieser Arbeit bereits wiederholt hingewiesen. Daß biologische ACTH-Bestimmungsmethoden (15, 16, 17, 19, 36, 40) diese Forderungen nur bezüglich der Spezifität, weniger dagegen in Bezug auf die Genauigkeit und Empfindlichkeit erfüllen können, ist bekannt. Deshalb sind in letzter Zeit immer wieder radioimmunologische Methoden zur ACTH-Bestimmung beschrieben worden (14, 27, 28), wie sie sich bei der Insulinbestimmung im Plasma auch schon klinisch bewährt haben. Eine der Grundvoraussetzungen für eine radioimmunologische Bestimmung von ACTH-Plasmaaktivitäten ist ein spezifischer Antikörper gegen biologisch aktives Hormon. Da gezeigt werden konnte, daß die Stimulation der Steroidgenese durch ACTH schon von den ersten 18 N-terminalen der insgesamt 39 Aminosäuren des ACTH-Moleküls erhalten wird (83), wäre ein Antikörper gegen diesen Teil des Peptids am günstigsten. Leider ist die antigene Aktivität dieser kurzkettigen Peptide, und somit die Ausbeute an Antikörper bildenden Tieren, nur gering (27, 29), da die Antigenwirkung mit Abnahme der Molekülgröße ebenfalls abnimmt (84). Außerdem sind Antikörper, die nur gegen den biologisch aktiven Teil des Hormons gerichtet sind, im ACTH-Neutralisationstest wegen der unspezifischen Inaktivierung des β^{1-23} Corticotropins durch Plasma von nicht immunisierten Tieren nicht nachzuweisen (ERGEBNISSE). Schon IMURA und Mitarbeiter (85) konnten zeigen, daß die kurzen N-terminalen ACTH-Peptide besonders durch Plasma inaktiviert wurden, das vor der Inkubation über Nacht eingefroren worden war (-20°C). Bei nativem ACTH und synthetischem Vollpeptid wurde von den gleichen Autoren nur eine sehr geringe Inaktivierung durch Plasma ohne Antikörper gegen ACTH gefunden, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Es wird deshalb angenommen, daß der biologisch inaktive, aber immunologisch aktive (31) C-terminale Peptidrest des Hormons eine wichtige Schutzfunktion gegen den nach manchen Autoren (86-88) vielleicht durch Plasmin induzierten enzymatischen Abbau des ACTH in vitro darstellt.

Bei der Erzeugung von Antikörpern gegen hochgereinigtes Schweine-ACTH bei Meerschweinchen stellten wir fest, daß eine zehnmahlige Injektion von 6 IE Schweine-ACTH, das einer Peptidmenge von etwa 0.05 mg entsprach, bei keinem von 7 Tieren zu Antikörperbildung führte. Eine Erklärung für die fehlende Antikörperbildung könnte in diesem Fall die zu geringe Antigenmenge sein. Damit zirkulierende Antikörper entstehen, muß das Antigen in ausreichender Menge mit den Antikörper bildenden Zellen in Kontakt kommen (84). Außerdem wirkt sich der immunsuppressorische Effekt der ACTH induzierten Erhöhung des Plasmacortisolspiegels ungünstig auf die Antikörperbildung aus und könnte somit die "Antigenschwellendosis" erhöhen. So fanden wir erst nachdem wir 15 Meerschweinchen mit 25 IE Schweine-ACTH (= 0.2 mg Peptid) immunisiert hatten, bei 20 % der Tiere neutralisierende Antikörper gegen ACTH (s. ERGEBNISSE). LIDDLE und Mitarbeiter (31), die 11 Meerschweinchen mit 20 IE Schweine-ACTH immunisierten, fanden in 58 % neutralisierende Antikörper. Bei Menschen, die mit 100 IE Depot-Schweine-ACTH behandelt worden waren, fand die gleiche Arbeitsgruppe sogar bei 8 von 9 Patienten Antikörper gegen ACTH (89). Diese unterschiedlichen Resultate können durch die jeweils recht geringe Versuchszahl der LIDDLEschen und unserer Arbeitsgruppe erklärt werden.

Neben dem Antikörper gegen ACTH wird zur radioimmunologischen Bestimmung des Adrenocorticotropins das radioaktiv markierte Hormon benötigt. Dabei ist eine hohe spezifische radioaktive Markierung des hochgereinigten Hormons erforderlich, um das markierte Hormon in so niedrigen Mengen dem Antikörper zusetzen zu können, daß Eich-ACTH-Mengen, bzw. unbekannte ACTH-Mengen gemessen werden können. Zur Markierung des ACTH wird entweder ^{131}J oder ^{125}J verwendet (27, 28, 43), mit dem sich eine genügend hohe spezifische Radioaktivität erzielen läßt (90). Der Nachteil der Jodmarkierung ist die harte Strahlung der ^{131}J und ^{125}J -Isotope, die zu einer radiochemischen Zerstörung des Peptids führen kann, dessen markierte und nicht markierte Bruchstücke die radioimmunologische ACTH-Bestimmung verfälschen können. Nicht markierte Bruchstücke, die durch den Antikörper gebunden werden (31), führen ebenso wie

freies ^{131}J oder nur an Tyrosin gebundenes ^{131}J , das nicht mehr durch den Antikörper gebunden werden kann, zu fälschlich hohen ACTH-Plasmaaktivitäten bei der radioimmunologischen Bestimmung. Nachdem zwischen dem Antikörper und den beiden Antigenen (radioaktiv markiertes Hormon und Eich-ACTH, bzw. unbekannte ACTH-Aktivität) ein stabiles Gleichgewicht eingetreten ist, muß der Antigen-Antikörperkomplex von dem nicht gebundenen freien Antigen getrennt werden. Dazu können Methoden wie Fällung durch einen zweiten Antikörper, der gegen den Anti-ACTH-antikörper (γ -Globulin) gerichtet ist, Elektrophorese, Ionenaustauschharze und Dextrangelfiltration dienen. Wird der Antigen-Antikörperkomplex durch Ionenaustauscher oder Dextrangelfiltration vom freien Antigen getrennt, so könnte es durch eine Bindung des Hormons an Serumproteine zu einer weiteren Verfälschung des Ergebnisses bei der radioimmunologischen Bestimmungsmethode von ACTH kommen. Die Serumproteine binden das freie nicht an Antikörper gebundene ACTH; dadurch wird weniger markiertes Hormon an das Ionenaustauschharz oder an Dextrangel gebunden, was zu fälschlich niedrigen ACTH-Plasmawerten führt.

Die für Thyroxin und Cortisol (91, 67) schon zu diagnostischen Zwecken ausgenutzte Proteinbindung dieser Hormone ist auch für einige Peptidhormone beschrieben worden (92, -95). Über ACTH lagen bisher widersprüchliche Ergebnisse vor. So konnten WOLF und Mitarbeiter (30) zeigen, daß ^{131}J - β^{1-24} Corticotropin bei der Elektrophorese auf vorher mit nicht markiertem Corticotropin gesättigten Papierstreifen mit den Serumweißkörpern wanderte. PFEIFFER und Mitarbeiter (43) fanden bei der Dextrangelfiltration von ^{131}J -markiertem Schweine-ACTH nur eine Bindung der radioaktiven "Degradationsprodukte" an das Serumprotein. Dabei ist die biologische Aktivität dieser "Degradationsprodukte" offenbar nicht geprüft worden, so daß nicht sicher ausgeschlossen werden kann, ob es sich nicht doch um proteingebundenes Hormon gehandelt hat. Wir fanden bei der Dextrangelfiltration eine starke Bindung des Tritium markierten β^{1-23} Corticotropin an das Dextrangel, die durch Elution mit 0.1 N HCl allein nicht zu lösen war (ERGEBNISSE). Erst nachdem wir die Säulen mit 5 % Albuminlösung abgesättigt hatten, konnten wir durch Serumproteine und 0.1 N HCl, oder

Salzsäure allein das ^3H -ACTH vollständig von der Dextrangelsäule eluieren. Dabei zeigte sich eine eindeutige Konkurrenz von Serum und Dextrangel bezüglich der ACTH-Bindung. Durch Veränderung der Dextrangel-, bzw. Serum-Menge ergab sich mittels Extrapolation eine Bindung von 70 bis 80 % des ACTH an Serumproteine.

Der Einwand, daß es sich bei dieser Versuchsanordnung um eine Verdrängung und nicht um eine echte Bindung handelt, muß genau analysiert werden.

1. Theoretisch ist es denkbar, daß bei der Albuminsättigung nur eine sehr geringe Albuminmenge dextrangelgebunden wird, welche bei der Säuleinchromatographie von ACTH-Lösungen ohne Serumproteinzusatz durch die möglicherweise größere ACTH-Peptidmenge teilweise von der Säule "verdrängt" wird. Folgt dem eine Elution mit überschüssigem Albumin, bzw. Serumprotein (7 mg bis 280 mg Protein), so "verdrängt" dieses Protein seinerseits das ACTH, welches somit nicht proteingebunden eluiert würde. Gegen diese Möglichkeit spricht die Überlegung, daß ein ACTH ($1\text{ }\mu\text{g}$) welches Albumin von der gesättigten Säule "verdrängen" sollte, genauso fest dextrangelgebunden sein müßte, wie ACTH, welches auf nicht mit Albumin gesättigte Säulen gegeben wurde. Dieses ACTH wäre nicht vollständig durch 0.1 N HCl-Zugabe - wie gezeigt - von der Säule zu eluieren. Da 0.1 N HCl jedoch das ACTH von der Albumin-gesättigten Säule nahezu vollständig eluierte (s. Ergebnisteil), scheidet diese Möglichkeit aus.
2. Es ist darüberhinaus unwahrscheinlich, daß $1\text{ }\mu\text{g}$ ACTH in proteinfreier Lösung das Albumin aus mit 150 mg Albumin gesättigten Säulen so quantitativ "verdrängen" kann, daß nicht doch ein gewisser Anteil des ACTH die Säule passiert. Wir fanden dagegen bei der Chromatographie von ^3H -ACTH ohne Serumzusatz in den ersten Fraktionen nur 3 - 4 % unspezifische Radioaktivität ohne biologische Aktivität.
3. Wir müssen daher diskutieren, daß das Dextrangel dem ACTH zwei Bindungsmöglichkeiten bietet. Der eine "Acceptor" bindet ACTH so, daß auch durch 0.1 N HCl diese Bindung nicht gelöst werden kann - wie im Ergebnisteil gezeigt -, wohingegen der zweite "Acceptor" das ACTH reversibel bindet. Ist

der erste "Acceptor" durch Albumin abgesättigt, so wird das ACTH nur noch labil an den zweiten gebunden und kann durch Serum und Salzsäure vollständig eluiert werden. Für den zweiten "Acceptor" des Dextrangels gelten wieder die unter 2. ausgeführten Überlegungen.

Dabei gilt für die zwei rein hypothetischen Acceptoren die Überlegung, daß die physikalisch-chemische Natur des Adsorptionsvorgangs vermutlich komplex, d.h. zusammengesetzt aus der Wirkung Coulombscher-, Van der Waals'scher Kräfte, u.a. ist. Die physikalisch-chemischen Grundlagen der Adsorption von ACTH an Dextrangel wurden hier nicht untersucht. Das erwähnte Modell soll nur dazu dienen, die erhaltenen Ergebnisse zu interpretieren. Dabei soll noch einmal hervor gehoben werden, daß das Dextrangel bei der Chromatographie von ACTH nicht als Molekülsieb wirkt, sondern das ACTH-Peptid bindet. Die Affinität von Tyrosin enthaltenden Peptiden und Tyrosinderivaten (z.B. Thyroxin) sowie anderen aromatischen Verbindungen (Corticosteroide, 67) zu Dextrangel (Sephadex G - 25) ist bekannt (98). Wir müssen in diesem Zusammenhang auch offen lassen, welche Rolle die Tatsache, daß Albumine die Dextrangelsäule mit dem Ausschlußvolumen passieren (bei Sephadex G - 25 werden Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 5000 ausgeschlossen) für die Änderung der ACTH-Bindung in albuminisierten Säulen spielt. ACTH könnte nach seinem Molekulargewicht in das innere Gelvolumen eindringen. Gegen die Möglichkeit, daß die stabilere (s.o.) ACTH-Bindung im inneren Gelbettvolumen stattfindet und die Albumine des ACTH am Eindringen in das innere Gelbettvolumen hindern, spricht die Beobachtung, daß Serumproteine, die nach dem ACTH auf eine nicht mit Albumin gesättigte Säule gegeben werden (Abb. 6), die stabile ACTH-Bindung an Dextrangel so verändern, daß eine vollständige Elution durch Säure wieder möglich wurde.

4. Eine andere Erklärung wäre die, daß nur ein "Acceptor" der ACTH und Albumine fest bindet, vorhanden ist. Durch Absättigung mit Albuminen würde die Bindungsvalenz des Acceptors im Dextrangel besetzt und das ACTH müßte dann durch eine freie Bindungsvalenz des dextrangelgebundenen Albumins labil gebunden werden. Es bestände somit keine direkte Competition zwischen Dextrangel und Serumprotein um das ACTH, sondern zwischen dem Dextrangelalbuminkomplex und den Serumeiweißkörpern bzw. Albumin.

Gegen diese Möglichkeit spricht, daß das ACTH auch dann vollständig eluiert werden konnte, wenn es auf nicht albuminisierte Säulen gegeben wurde, und erst nach dem ACTH Serum auf die Säule gegeben wurde (s.o.). Danach müßte, wenn wir bei der letzten Hypothese bleiben, das Albumin das ACTH zuerst aus seiner Bindung an Dextrangel verdrängen und anschließend das frei gewordene ACTH wieder binden. Dann müßte aber auch der Teil des Albumins, der die Säule ungehindert passiert, ACTH binden können. Dies aber würde bedeuten, daß praktisch die gesamte ACTH-Menge nach Elution mit z.B. 2 ml Serum von der Säule herunterkommen müßte, da ja nur ein sehr geringer Anteil des Albumins auf der Säule bleibt und das ACTH auf der Säule festhalten könnte, wohingegen die weitaus größere Menge Albumin die Säule ungehindert passiert.

Daß es sich um eine echte Bindung des ACTH an Serumprotein und nicht um eine Verdrängung handelt, wurde durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation von β^{1-23} Corticotropin bewiesen. Die deutlich stärkere Sedimentation des mit Serumprotein oder Albumin inkubierten Hormons gegenüber dem Hormon allein, lassen sich nur durch dessen Bindung an Serumproteine, insbesondere Albumine erklären. Die mit der gleichen Technik durchgeführte Zentrifugation von ^{14}C -Cortisol (s.ERGEBNISSE) ergab bei Inkubation mit Serumproteinen ebenfalls eine stärkere Sedimentation, mit Albuminen allein dagegen keine stärkere Sedimentation, da Cortisol durch Cortisol bindende Globuline (CBG) und nicht durch Albumin gebunden wird (96,63). Für ACTH hingegen muß in allerdings unphysiologisch hohen Konzentrationen eine Bindung an unspezifische Albumine angenommen werden. Bei nativem Schweine-ACTH und endogenem ACTH fanden wir in qualitativen Untersuchungen entsprechende Ergebnisse. Ob an Eiweiß gebundenes ACTH biologisch aktiv ist, hängt davon ab, um welches ACTH-Peptid es sich handelt. Kurze ACTH-Peptide (z.B. β^{1-23} Corticotropin) werden durch Inkubation mit Serum weitgehend inaktiviert (s.ERGEBNISSE), wohingegen die biologische Aktivität des Vollpeptids ($^{1-39}$ ACTH) durch Serumzusatz nicht vermindert wird.

Weiterhin ist auffällig, daß die kurzkettigen Peptide in allen biologischen ACTH-Bestimmungen, bei denen das Hormon auf direktem Wege an seinen Wirkungsort gebracht wird (intraaortale, intravenöse Applikation), aktiver sind als das Vollpeptid. Bei der subcutanen Applikation, bei der der Weg zum Wirkungsort verzögert ist, ist das Vollpeptid wirksamer (35,38,39,97), da dies wahrscheinlich durch den C-terminalen Peptidrest vor schnellem Abbau geschützt wird. Dies ist sicher ein weiterer Faktor der an sich beträchtlichen Problematik der Standardisierung und Bestimmung der adrenocorticotropen Aktivität von ACTH-Peptiden mit in vitro und in vivo Methoden. Ob die radioimmunologische Bestimmungsmethode für ACTH unter Beachtung der zahlreichen Probleme jemals allein ausreichend sein wird, oder ob wir immer biologisch bestimmte ACTH-Aktivität und immunologisch bestimmtes ACTH als zwei verschiedene Größen betrachten müssen, wird die Zukunft zeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die Bindung von ACTH an Serumproteine wurde mit Hilfe der Dextrangelfiltration, der Dichtegradientenzentrifugation und der Bestimmung der biologischen ACTH-Aktivität untersucht. Im methodischen Teil der Arbeit wurde die Dextrangelfiltration mit Sephadex G-25, die Saccharosedichtegradientenzentrifugation, die biologische ACTH-Bestimmung an der hypophysekтомierten Ratte und ferner eine Methode zur Extraktion von ACTH aus Tumorgewebe und die Immunisation von Meerschweinchen mit ACTH detailliert beschrieben.
- 2) Mittels Dextrangelfiltration wurde Tritium markiertes β^{1-23} Corticotropin von unspezifischer Radioaktivität ohne biolog. Aktivität gereinigt. Inkubation des gereinigten ^3H -ACTH mit Serum und anschließende Dextrangelchromatographie zeigte eine kompetitive Bindung von ^3H -ACTH durch Serumproteine und Dextrangel, wie sie in Vorversuchen mit nicht markiertem β^{1-23} Corticotropin und nativem Schweine-ACTH wahrscheinlich gemacht werden konnte. Nach Inkubation von ^3H -ACTH mit zunehmenden Serumengen, wurde ein ebenfalls zunehmender Anteil des ^3H -ACTH als proteingebunden eluiert. Dabei war die Menge Dextrangel, bzw. die Säulenhöhe konstant. Wurde die Säulenhöhe variiert und die Serummenge im ^3H -ACTH-Inkubationsgemisch konstant gelassen, so wurde bei abnehmender Säulenhöhe ein zunehmender Anteil des ACTH proteingebunden eluiert. Extrapolation führte bei unphysiologisch hohem ACTH-Gehalt im Inkubationsgemisch zu einem Wert von 70 bis 80 % proteingebundenem ACTH im Serum. Die Bindung von endogenem ACTH an Serumproteine konnte nach dem gleichen Verfahren qualitativ nachgewiesen werden.
- 3) Bei der Dichtegradientenzentrifugation sedimentierte ^3H -ACTH oder nicht markiertes ACTH (biologischer Nachweis), das mit Serum oder Humanalbumin inkubiert worden war, weiter als ohne Proteine inkubiertes ACTH, welches an der Oberfläche des Gradienten blieb. Die Untersuchungen mit Dextrangelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation zeigten, daß die Serumprotein-

bindung von ACTH durch die Albuminfraktion bedingt ist.

- 4) Ferner wurden zwei Patientinnen mit ektopischem ACTH-Syndrom (Pankreas-Carcinom mit Cushing-Syndrom) untersucht. Das Fehlen einer Differenz der ACTH-Plasmaspiegel zwischen Bulbus cranialis venae jugularis und peripher venösem Blut wurde gezeigt und als Möglichkeit zur Diagnostik von ektopischer ACTH-Bildung diskutiert.
- 5) Schließlich wurde die Bildung von Antikörper gegen ACTH untersucht. Immunisation von Meerschweinchen mit 6 IE Schweine-ACTH konnte bei keinem von 7 Tieren neutralisierende Antikörper gegen ACTH hervorrufen. Erst Immunisation mit 25 IE Schweine-ACTH führte bei 3 von 15 Tieren zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Mit synthetischem β^{1-23} Corticotropin fanden wir im biologischen ACTH-Neutralisationstest im Gegensatz zum nativen Vollpeptid eine Inaktivierung der biologischen ACTH-Aktivität durch Serum nicht vorbehandelter Tiere.
- 6) Die Problematik biologischer und immunologischer Bestimmungsmethoden für ACTH-Plasmaspiegel wird im Zusammenhang mit der gefundenen Serumproteinbindung von ACTH besprochen.

S U M M A R Y

- 1) The binding of ACTH to serum proteins was investigated using dextran gel filtration, density gradient centrifugation and bioassay of ACTH. Dextran gel filtration with Sephadex - G - 25, sucrose density gradient centrifugation and bioassay of ACTH on the hypophysectomized rat and in addition a method for the extraction of ACTH from tumor tissue and the immunisation of guinea pigs with ACTH has been described in detail.
- 2) With the help of dextran gel filtration tritiated β^{1-23} Corticotropin was purified from unspecific radioactivity without biological ACTH-activity. Incubation of ^3H -ACTH with serum and subsequent dextran gel chromatography showed a competitive binding of ^3H -ACTH by serum proteins and by dextran gel, as had been suggested by the pilot studies with unlabelled corticotropin and ACTH, which had been extracted from pig pituitaries. After incubation of ^3H -ACTH with increasing amount of serum a likewise increasing portion of the ^3H -ACTH was eluted as protein bound. During this procedure the amount of dextran gel, respectively the height of the column was kept constant. When the height of the column was changed and the amount of serum in the ^3H -ACTH-incubation mixture kept constant, we found that with a decreasing height of the column an increasing portion of the ACTH eluted as protein bound. Extrapolation led to a value of 70 to 80 % of protein bound ACTH, admittedly at rather unphysiological levels of ACTH in the incubation mixture. The binding of endogenous ACTH to serum proteins was revealed qualitatively by the same technique.
- 3) During density gradient centrifugation ^3H -ACTH or unlabelled ACTH (bioassay), which was incubated with serum or human albumin sedimentated further than ACTH without serum incubation, which remained on the surface of the gradient. The investigations with dextran gel filtration and density gradient centrifugation showed that the binding of ACTH by serum protein was caused by the albumin fraction.
- 4) Furthermore two patients with ectopic ACTH-syndrome (carcinoma of the pancreas with Cushing-syndrome) were investigated. The lack of a difference between the ACTH plasma levels of the bulbus cranialis venae

jugularis and of the peripheral venous blood was demonstrated and discussed as a possibility for the diagnosis of ectopic ACTH production.

- 5) Finally the production of antibodies against ACTH was investigated.

Immunisation of guinea pigs with 6 IU pig-ACTH did not evoke neutralizing antibodies in the immunized animals. Only immunisation with 25 IU pig-ACTH caused neutralizing antibodies against ACTH in 3 out of 15 guinea pigs. In contrast to pituitary extracted 1-39 ACTH-peptide the synthetic 1-23 ACTH-peptide was inactivated by serum of nonimmunized animals.

- 6) The problems of biological and immunological determinations of ACTH plasma levels is discussed in connexion with the previously described protein binding of ACTH.

LITERATURVERZEICHNIS

1. SMITH, Ph.E.: Hypophysektomy and replacement therapy in the rat. Amer. J. Anat. 45, 205-273 (1930)
2. COLLIP, J.B., E.M. ANDERSON and D.L. THOMSON: The adrenotropic hormone of the anterior pituitary lobe. Lancet, 347, II (1933)
3. ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN u. L. HEROLD: Über das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens. Klin. Wschr. 12, 209 (1934)
4. ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN u. L. HEROLD: Das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens. Arch. Gynaekol. 157, 86-102 (1934)
5. LI, C.H., H.M. EVANS and M.E. SIMPSON: Isolation of adrenocorticotrophic hormone from sheep pituitaries. Science 96, 450 (1942)
6. LI, C.H., J.J. GESCHWIND, A.L. LEVY, I. HARRIS, I.S. DIXON, N.G. PON and J.O. PORATH: Isolation and properties of alpha-corticotropin from sheep pituitary glands. Nature 173, 251-253 (1954)
7. LEVY, A.L., J.J. GESCHWIND, Corticotropins (ACTH) II. Aminoacid composition and C.H. Li: of α -corticotropin. J. Biol. Chem. 213, 187-196 (1955)
8. LI, C.H., J.J. GESCHWIND, Amino-acid sequence of α -corticotropin. R.D. COLE, J.D. RAACKE, Nature 176, 687 (1955) J.I. HARRIS and J.S. DIXON:
9. LI, C.H., J. MEINENHOFER, Synthesis of a biologically active nonachapeptide E. SCHNABEL, D. CHUNG, corresponding to the first nineteen amino acids re- T. LO and I. RAMACHANDRAN: sides of adrenocorticotropins. J. Am. Chem. Soc. 83, 4449-4457 (1961)
10. SCHWYZER, R. and P. SIEBER: Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone. Nature 199, 172 (1963)
11. VANCE, V.K., W.J. REDDY, ACTH in human plasma. J. clin. Invest. 41, 20 (1962) D.H. NELSON and G.W. THORN:
12. NEY, R.L., N. SHIMIZU, Correlation of plasma ACTH concentration with adre- W.E. NICHOLSON, D. P- nocortical response in normal human subjects, surgi- ISLAND and G.W. LIDDLE: cal patients and patients with Cushing's disease. J. clin. Invest. 42, 1969 (1963)
13. RETIENE, K., A. ESPINOZA, Über das Verhalten von ACTH und Cortisol im Blut von K.H. MARX u. E.F. PFEIFFER: Normalen und von Kranken mit primärer und sekun- därer Störung der Nebennierenrindenfunktion. Klin. Wschr. 43, 205 (1965)

14. HIROSHI, D. C., D. WEST, C. A. NUGENT, K. NAKAGAWA and F. H. TYLER: A sensitive radioimmunoassay for plasma ACTH levels. *J. Clin. Endocr.* 26, 1297 (1966)
15. SAYERS, M. A., G. SAYERS and L. A. WOODBURY: The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid depletion method. *Endocrinology* 42, 379-393 (1948)
16. LIPSCOMB, H. S. and D. H. NELSON: A sensitive biologic assay for ACTH. *Endocrinology* 71, 13 (1962)
17. GIRARD, F. and V. K. VANCE: Modification of the Lipscomb-Nelson bio-assay for ACTH. *Endocrinology*, 71, 325 (1962)
18. ZENKER, N. and D. E. BERNSTEIN: The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J. biol. Chem.* 231, 695 (1958)
19. SCRIBA, P. C., R. HACKER, P. DIETERLE, F. KLUGE, W. HOCHHEUSER u. K. SCHWARZ: ACTH-Bestimmungen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis. *Klin. Wschr.* 44, 1393 (1966)
20. SCRIBA, P. C.: Klinische und experimentelle Untersuchungen über Dynamik und Wirkungsweise des Adrenocorticotropins. Habilitationsschrift, München (1966)
21. KLUGE, F.: Zur biologischen Bestimmung von ACTH-Plasmaspiegeln: Verteilung von endogenem ACTH im Körper und Bindung an Serumproteine. Dissertation, München (1967)
22. v. WERDER, K., F. KLUGE, K. SCHWARZ u. P. C. SCRIBA: Determination of serum protein binding of ^3H -ACTH using dextran gel filtration and density gradient centrifugation. *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* 119, 182 (1967)
23. PFEIFFER, E. F., F. GARMENDIA, E. VAUBEL u. K. RETIENE: Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten im nativen Plasma des Menschen. *Erg. Inn. Med.*, N. F. 20, 127 (1963)
24. LIDDLE, G. W., D. ISLAND and C. K. MEADOR: Normal and abnormal regulation of corticotropin secretion in man. *Rec. Progr. Horm. Res.* 18, 125 (1962). Edited by Gregory Pincus, Academic Press, N. Y. and London
25. WILLIAMS, W. L., D. ISLAND, R. A. A. OLFIELD and G. W. LIDDLE: Blood corticotropin (ACTH) levels in Cushing's disease. *J. clin. Endocrin.* 21, 426 (1961)
26. YALOW, R. S. and S. A. BERSON: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.* 39, 1157 (1960)
27. FELBER, J.-P., A. J. MOODY, A. VILLANUEVA et A. VANNOTTI: Détermination radio-immunologique de l'insuline et de l'ACTH en clinique. *Bulletin de l'Académie Suisse de Sciences Médicales*, 21, 261-275 (1965)

28. YALOW, R. S., S. M. GLICK, J. ROTH and S. A. BERSON: Radioimmunoassay of human plasma ACTH. *J. clin. Endocrin.* 24, 1219 (1964)
29. IMURA, H., L. L. SPARKS, G. M. GRODSKY and P. H. FORSHAM: Immunologic studies of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Dissociation of biologic and immunologic activities. *Journ. of Clinical Endocrin. a. Metab.* 25, 1361-1364 (1965)
30. WOLF, R. L., M. MENDLOWITZ, L. J. SOFFER, J. ROBOZ and S. E. GITLOW: Metabolism of corticotropin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 244 (1965)
31. FLEISCHER, N., J. R. GIVENS, K. ABE, W. E. NICHOLSON and G. W. LIDDLE: Studies of ACTH antibodies and their reactions with inactive analogues of ACTH. *Endocrinology*, 78, 1067-1075 (1966)
32. YAVORSKY, P. M., and E. GORIN: New reagent for labeling organic compounds with tritium. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 1071 (1962)
33. COLLIPP, P. J., S. A. KAPLAN, D. C. BOYLE, C. S. N. SHIMIZU and S. M. LING: Tritium-labelled peptide hormones with high specific radioactivity. *Nature*, 207, 876 (1965)
34. LEONIS, J.: Tritiation de Protéines et de Peptides par Echange. *Proceedings of the Conference on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules. Euratom*, 1964, p. 269
35. VOGEL, H. G.: Evaluation of synthetic peptides with ACTH-activity. *Acta endocrin. (Kbh)* 100, 34 (1965)
36. SAFFRAN, M. and A. V. SCHALLY: In vitro bioassay of corticotropin: Modification and statistical treatment. *Endocrinology* 56, 523 (1955)
37. RUF, K.: Bestimmungsmethoden für ACTH beim Menschen. *Schweiz. med. Wschr.* 96, 684 (1966)
38. LI, C. H.: Synthesis and biological properties of ACTH peptides. *Rec. Progr. in Horm. Res.* 18, 1 (1962)
Edited by Gregory Pincus, Academic Press, NY and London.
39. BARTHE, P., P. A. DESAULLES, B. SCHÄR, M. STAEHELIN: Biological activity of synthetic β -corticotropin. *Nature*, 202, 908 (1964)
40. HACKER, R.: Biologische Bestimmung der ACTH-Aktivität im menschlichen Plasma. *Dissertation, München* (1967)

41. FLODIN, P.: Dextran gels and their applications in gel-filtration. Dissertation, Uppsala (1962)
42. LANDGRAF, R.: Schilddrüsenfunktionsdiagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Bestimmung der Bindung von L-Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextrangelfiltration. Dissertation, München (1966)
43. MELANI, F., K.M. BARTELT, R. CONRADs and E.F. PFEIFFER: Die Jod¹³¹-Markierung von Insulin ACTH und STH mit hoher spezifischer Aktivität zur Anwendung in der radioimmunologischen Methode. Z. klin. Chem. 4, 189 (1966)
44. A TECHNICAL REVIEW: An introduction to density gradient centrifugation. Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, Calif., USA (1960)
45. MARTIN, R. G. und B. N. AMES: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. J. biol. Chem. 236, 1372 (1961)
46. BRITTEN, R. J. und R. B. ROBERTS: High-resolution density gradient sedimentation analysis. Science 131, 32 (1960)
47. FRIES, M.: Versuche über die Steigerung der Nebennieren-Protein-Synthese durch ACTH. Dissertation, München (1967)
48. LOWRY, O. R., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. V. RANDALL: Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
49. LEDERER, M.: Introduction to paper electrophoresis and related methods. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam u. New York (1955)
50. WUNDERLY, Ch.: Die Papierelektrophorese. Verlag Sauerländer und Co. Aarau u. Frankfurt a.M. (1959)
51. BELL, C. G. und F. N. HAYES: Liquid scintillation counting. Pergamon Press, New York, (1958)
52. HANSEN, D. L., and E. T. BUSH: Improved solubilization procedures for liquid scintillation counting of biological materials. Analytical Biochemistry, 18, 320 (1967)
53. BUSH, E. T., D. L. HANSEN: Improvement of liquid scintillation counting efficiencies by optimisation of scintillator composition. "Radioisotope Sample Measurement Techniques in Medicine and Biology!" International Atomic Energy Agency, Wien, 395-408 (1965)
54. FARESE, R. V. and W. J. REDDY: Effect of ACTH on adrenal protein synthesis. Endocrinology 73, 294 (1963)

55. FREUD, J.: Die Hypophysektomie. In "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden." Herausg. E. ABDERHALDEN, Abt. V, Teil 3BII, S. 1442. Urban u. Schwarzenberg, Berlin (1938)
56. WERK, E. E., K. F. THEIS, Y. K. CHOI, R. T. MARNELL: Interference of heparin containing benzyl alcohol in the fluorometric determination of plasma corticosteroids. J. clin. Endocrinol. 27, 1350 (1967)
57. MÜLLER, A.: Dissertation, Universität München (1968) in Vorbereitung.
58. PFEIFFER, E. F., W. E. VAUBEL, K. RETIENE, D. BERG u. H. DITSCHUNEIT: ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason hypophysen-blockierten Ratte. Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
59. KORTÜM, G. und M. KORTÜM-SEILER: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER "Handbuch", Bd. I, Seite 312 ff., Springer 1953
60. LIDDLE, G. W., D. P. ISLAND, R. L. NEY, W. E. NICHOLSON and N. SHIMIZU: Nonpituitary neoplasms and Cushing's syndrome. Arch. intern. Med., 111, 471. (1963)
61. RABEN, M. S., V. W. WESTERMEYER: Differentiation of growth hormone from the pituitary factor which produces diabetes. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 80, 83. (1952)
62. NELSON, D. H., J. W. MEAKIN and G. W. THORN: ACTH-producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing's syndrome. Ann. Intern. Med. 52, 560 (1960)
63. MÜLLER-BARDORFF, M.: Funktionsuntersuchungen der menschlichen Nebennierenrinde mit Hilfe der Bestimmung der sogenannten 11-Hydroxycorticosteroide und der Cortisol-Bindungsverhältnisse im Plasma. Dissertation, München (1968) in Vorbereitung.
64. BROWN, W. H.: A case of pluriglandular syndrome "Diabetes of a bearded women". Lancet II, 1022 (1928)
65. LIDDLE, G. W., J. R. GIVENS, W. E. NICHOLSON and D. P. ISLAND: The ectopic ACTH-syndrome. Cancer Research. 25, 1057 (1965)
66. PFOTENHAUER, R. und J. KRACHT: Die extrahypophysären corticotropen Geschwülste. Endokrinologie 51, 23 (1967)

67. MÜLLER-BARDORFF, M., Effect of ACTH-infusion tests on Cortisol-
W. HOCHHEUSER, K. SCHWARZ -4-C¹⁴ binding to plasma proteins.
and P. C. SCRIBA: Acta endser. (Kbh.) 119, 180 (1967)
68. HÄNZE, S.: Die endokrin bedingten hypokaliämischen
Alkalosen. Dt. med. Wschr. 92, 1033 (1967)
69. FRIEDMAN, M., J. R. Cushing's syndrome associated with carcinoma
MIKHAIL, K. D. BHOOLA: of the bronchus in a patient with normal
plasma electrolytes. Brit. Med. Journ. 1,
27-29 (1965)
70. MARKS, L. J., D. L. Cushing's syndrome and corticotropinsecreting
ROSENBAUM and carcinoma of the lung. Ann. Int. Med. 58,
A. B. RUSSFIELD: 143-149, (1963)
71. HALLWRIGHT, G. P., Pigmentation and Cushing's syndrome due
K. A. K. NORTH and J. D. to malignant tumor of the pancreas. J. Clin.
REID: Endocrinol. and Metab. 24, 496-500 (1964)
72. AUGUST, J. T., and H. H. Severe Hypoglycemia Secondary to Non-
HIATT: pancreatic Fibrosarcoma with Insulin
Activity. New. Eng. J. Med. 258: 17-20 (1958)
73. HUNG, W., R. M. Precocious puberty in boy with hepatoma
BLIZZARD, C. J. MIGEON, and circulating gonadotropin. J. Pediat.
A. M. CAMACHO and W. L. 63: 895-903 (1963)
HYHAN:
74. ODELL, W. D., R. W. Increased thyroid function without clinical
BATES, R. S. RIVLIN, M. B. hyperthyroidism in patients with choriocarcinoma.
LIPSETT and R. HERTZ: J. Clin. Endocrinol. and Metab. 23: 658-664
(1963)
75. TASHJIAN, A. H. Jr., Immunochemical identification of parathyroid
LEVINE, L. and MUNSON, hormone in non-parathyroid neoplasms associated
P. L.: with hypercalcemia. J. Exper. Med. 119: 467-484,
(1964)
76. GOLDMAN, K. P.: Gynaecomastia and bronchial carcinoma. Brit.
J. Dis. Chest. 55: 162-165 (1961)
77. AMATRUDA, T. T., Jr., Carcinoma of lung with inappropriate anti-
P. J. MULROW, J. C. diuresis: Demonstration of antidiuretic-hormone-
GALLAGHER and W. H. like activity in tumor extract. New Eng. J. Med.
SAWYER: 269: 544-549 (1963)
78. PEART, W. S., K. A. Carcinoid syndrome due to pancreatic-
PORTER, J. I. S. duct neoplasm secreting 5-hydroxy-tryptamine.
ROBERTSON, M. SANDLER Lancet 1, 239-243 (1963)
and I. BALDOCK:

79. GREGORY, R. A., M. I. GROSSMAN, H. J. TRACY, P. H. BENTLEY: Nature of the gastric secretagogue in Zollinger-Ellison tumours. *Lancet* II, 543 (1967)
80. LAW, D. H., G. W. LIDDLE, H. W. SCOTT and S. D. TAUBER: Ectopic Production of multiple hormones (ACTH, MSH and GASTRIN) by a single malignant tumor. *New England Journal of Medicine* .273: 292-296 (1965)
81. v. LANZ, T. und W. WACHSMUTH: *Praktische Anatomie* Bd. I, 2. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955), 31
82. SCRIBA, P. C., K. v. WERDER, J. RICHTER und K. SCHWARZ: Ein Beitrag zur klinischen Diagnostik des ektopischen ACTH-Syndroms. *Klin. Wschr.* (1968) im Druck.
83. RAMACHANDRAN, J., D. CHUNG and C. H. LI: *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 2696 (1965)
84. SCHMIDT, H.: Serologische Grundlagen aus "Allergie", herausgegeben von K. HANSEN. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1957)
85. IMURA, H., H. MATSUYAMA, S. MATSUKURA, T. MIYAKE and M. FUKASE: Stability of ACTH preparations in human plasma incubated in vitro. *Endocrinology* 80, 599 (1967)
86. MIRSKY, I. A., G. PERISUTTI, N. C. DAVIS: The destruction of glucagon, adrenocorticotropin and somatotropin by human blood plasma. *J. Clin. Invest.* 38, 14 (1959)
87. WHITE, W. F. and A. M. GROSS: *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 1141 (1957)
88. HOPKINS, T. F., C. TERNER and G. PINCUS: Preparation and properties of the cofactor of an ACTH-inactivating enzyme system from human blood. *Endocrinology* 69, 728 (1961)
89. FLEISCHER, N., K. ABE, G. W. LIDDLE, D. N. ORTH and W. E. NICHOLSON: ACTH antibodies in patients receiving depot procine ACTH to hasten recovery from pituitary-adrenal suppression. *J. Clin. Invest.* 46, 196 (1967)
90. GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER and J. S. GLOVER: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114 (1962)
91. LANDGRAF, R., H. G. HEINZE, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA: Clinical evaluation of determinations of free and serum protein bound Triiodothyronine (dextran gel filtration). *Vth Acta Endocr. Congress, Hamburg* (1965)

92. ANTONIADES, H. N.,
A. M. HUBER, B. R.
BOSHELL, C. A. SARAVIS
and S. N. GERSHOFF:
Studies on the state of insulin in blood:
Properties of circulating "free" and "bound"
insulin. *Endocrinology* 76, 709-721 (1965)
93. ABDEL RAHMAN, J. M.,
A. MUCCI, R. MORCOS,
R. PETZOLDT, G. MACHT,
H. DITSCHUNEIT und
E. F. PFEIFFER:
Der Einfluß der Leber auf die Transportform
von endogenem Insulin und die Wirkung von
endogenem Insulin auf den Leberzellstoffwechsel.
10. Sympos. der Dtsch. Gesellsch. f. Endokrin.
256-259 (1963)
94. PFEIFFER, E. F.:
Über die biologische Bedeutung des Trans-
portes und der Eiweißbindung von endogenem
und exogenem Insulin im Blut. *Materia Med.*
Nordmark. XVII/16 (1965)
95. Mac MILLAN, D. R.,
J. M. SCHMID, S. A.
EASH:
Studies on the heterogeneity and serum binding
of human growth hormone. *J. Clin. Endocrin.*
27, 1090 (1967)
96. De MOOR, P. and
W. HEYNS:
Cortisol binding capacity of plasma transcortin
in diabetic subjects. *J. Clin. Endocrin.* 27, 706 (1967)
97. LEBOVITZ, H. E.,
and F. L. ENGEL:
Relationship between the structure and biological
activities of corticotropin and related peptides:
Biological activities of a sythetic Eicosapeptide
amide. *Endocrinology*, 75, 831 (1964)
98. DETERMANN, H.:
Gelchromatographie. Springer-Verlag.
Berlin, Heidelberg, New York (1967)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 15.12.1940 in Darmstadt geboren. Meine Eltern sind der Chemiker Dr. phil. Fritz von Werder und seine Gemahlin Gerda von Werder, geb. v.Esmarch. Von 1946 bis 1951 besuchte ich die Volksschule, von 1951 bis 1960 das humanistische Gymnasium in Darmstadt, wo ich im Februar 1960 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1960/61 begann ich das Medizinstudium in Heidelberg. Dort bestand ich im Oktober 1961 das Vorphysikum.

Die nächsten drei Semester studierte ich an der Freien Universität Berlin, wo ich im April 1963 mein Physikum ablegte. Mein klinisches Studium absolvierte ich an der Freien Universität Berlin, der Universität Zürich und der Universität Heidelberg, wo ich im Juli 1966 das Staatsexamen bestand.

Seit September 1966 arbeite ich als Medizinalassistent im Labor für experimentelle Endokrinologie der II. Med. Klinik der Universität München.

Während dieser Zeit entstand, teilweise neben klinischer Tätigkeit, die vorliegende Dissertation.

Seit Juli 1966 bin ich mit der Sprachlehrerin Johanna v. Werder, geb.Knacke, verheiratet.

